INDUZIERT INSULIN DIE AGGREGATION SEINES REZEPTORS?

EINE AUTORADIOGRAPHISCHE ANALYSE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

CLAUDIA GIESEN

aus Krefeld

Düsseldorf 1986

INDUZIERT INSULIN DIE AGGREGATION SEINES REZEPTORS? EINE AUTORADIOGRAPHISCHE ANALYSE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

CLAUDIA GIESEN
aus Krefeld

Düsseldorf 1986

Referent: Frau Priv.-Doz. Dr. E. Junger
Korreferent: Herr Prof. Dr. K.-D. Spindler

Tag der mündlichen Prüfung: 18.7.86

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. E I N L E I T U N G — Seite

I.1. Die Interaktion von Insulin mit seinem Rezeptor und die Folgereaktionen — 1

I.2. Die Problemstellung der vorliegenden Arbeit — 9

II. M A T E R I A L

II.1. Chemikalien — 15

II.2. Puffer — 16

II.3. Gradientenmedien — 17

II.4. Weitere Medien — 17

III. M E T H O D E N

III.1. Die Isolation der mononukleären Leukozyten — 18

III.2. Insulinbindung der mononukleären Leukozyten — 23

2.1. Inkubationsbedingungen — 23

2.2. Die Quantifizierung der 125I-Insulinbruchstücke im eingesetzten Tracer und nach der Inkubation — 24

2.3. Die Abtrennung des nicht gebundenen Insulins — 25

2.3.1. Die Ölzentrifugationstechnik — 25

2.3.2. Die Percoll^{TM}-Gradientenzentrifugation — 26

2.4. Die Bestimmung der Affinitätskonstanten K_a und der Rezeptorkonzentration R_0 — 28

III.3. Lokalisation des 125I-Insulins auf der Zelloberfläche — 30

3.1. Die Herstellung der Zellausstrichpräparate — 33

3.2. Befilmung der Zellausstrichpräparate mit der Ilford-L_4 Photoemulsion — 35

3.3. Exposition, Entwicklung und Fixierung der Autoradiogramme — 37

3.4. Die Auswertung der Zellausstrichautoradiogramme — 38

3.5. Die Berechnung der Konzentration an Insulin-Rezeptor-Komplexen aus der Silberkorndichte — 41

III.4. Quantifizierung des internalisierten Anteils an 125I-Insulin — 43

4.1. Die Bestimmung des internalisierten Anteils an 125I-Insulin durch Ansäuern des umgebenden Mediums — 43

4.2. Die Bestimmung des internalisierten Anteils an 125I-Insulin mittels Autoradiographie von Semidünnschnitten 44
III.5. Verteilungsstudien der Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Zelloberfläche von Monozyten 48
5.1. Die Abstandsbestimmung zwischen nächsten Nachbarn 48
5.2. Die Quadratmethode 52

IV. E R G E B N I S S E

IV.1. Der Tracer 53
IV.2. Untersuchungen zur Insulinbindung: Optimierung der Markierungsbedingungen und Interpretationshilfen für die Autoradiographie 55
2.1. Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Insulinbindung 57
2.2. pH-Abhängigkeit der Insulinbindung 59
2.3. Konzentrationsabhängigkeit der Insulinbindung: Bestimmung der Affinitätskonstanten K_a und der Rezeptorkonzentration R_0 63
2.4. Der Anteil der unspezifischen Bindung 69
2.5. Die Dissoziation des gebundenen Insulins bei Raumtemperatur 72
2.6. Der Anteil von 125I-Insulinbruchstücken 74
IV.3. Einfluß der Morphologie der mononukleären Leukozyten auf die autoradiographische Auswertung von Zellausstrichpräparaten 77
IV.4. Autoradiographischer Nachweis von 125I-Insulin bzw. 125I-Insulin-Rezeptor Komplexen auf Monozyten und Lymphozyten 92
4.1. Relative Bindungsanteile von Monozyten und Lymphozyten 94
4.2. Prüfung auf Monozyten-Subpopulationen 104
4.3. Die Abschätzung der Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Zelloberfläche gespreiteter Monozyten 110
4.4. Abschätzung des internalisierten Anteils an 125I-Insulin 116
4.4.1. Abschätzung des internalisierten Anteils an 125I-Insulin durch Ansäuern des umgebenden Milieus 118
4.4.2. Abschätzung des internalisierten Anteils an 125I-Insulin mittels Autoradiographie von Semidünnschnitten 124
IV.5. Analyse der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auf der Zelloberfläche von Monozyten 133
5.1. Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auf kugelförmigen Monozyten 133

5.2. Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auf gespreiteten Monozyten 136
5.2.1. Die Eignung der gespreiteten Monozyten zur Verteilungsanalyse 136
5.2.2. Analyse der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auf gespreiteten Monozyten mittles Abstandsmethode 143
5.2.2.1. Die Verteilungsmodelle 143
5.2.2.2. Die Einteilung der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen auf der Oberfläche gespreiteter Monozyten in zufällige, regelmäßige und segregierte Verteilungen 162
5.2.2.3. Die Verteilungsanalysen mit der Quadratmethode 173

V. D I S K U S S I O N 177

VI. Z U S A M M E N F A S S U N G 214

VII. L I T E R A T U R 217

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0009

I. E I N L E I T U N G

I.1. DIE INTERAKTION VON INSULIN MIT SEINEM REZEPTOR UND DIE FOLGEREAKTIONEN

Das Peptidhormon Insulin spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation des Kohlehydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsels. Die biologischen Wirkungen des Insulins sind vielfältig, sie umfassen die Aktivierung von Transportsystemen für Hexosen, Aminosäuren und Ionen, die Aktivierung (z.B. der Glykogensynthase) bzw. Inaktivierung (z.B. der Adipozyten-Lipase) von Enzymsystemen und die Stimulation der Proteinbiosynthese, der DNA-Synthese, des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung (CZECH 1977, CZECH 1980, KAHN et al. 1981). Die Effekte des Insulins variieren bezüglich ihres Zeitverlaufs und ihrer Dosisabhängigkeit. Einige Effekte wie die Modulation der Glukoseaufnahme treten bereits in einem Zeitintervall < 1 Minute auf, die Wirkung auf die meisten cytoplasmatischen Enzyme liegt im Bereich von 1-30 Minuten, während Modulationen der DNA-Synthese erst nach mehrstündiger Insulineinwirkung auftreten. Diese in vitro gemessenen, langsamen Wachstumseffekte erfordern außerdem im Vergleich zu den raschen Antworten (10^{-11}-10^{-8} mol/l) zumeist eine höhere Hormonkonzentration (10^{-8}-10^{-6} mol/l) (KAHN et al. 1981).

Damit Insulin eine biologische Wirkung ausüben kann, muß zunächst eine Interaktion zwischen dem Hormon und den Zellen seiner Zielgewebe stattfinden.
Bereits LEVINE (1955) postulierte als ersten Schritt der Insulinwirkung die Bindung des Hormons an einen plasmamembranständigen Insulinrezeptor, dieses Konzept wurde von CUATRECASAS (1971) aufgegriffen. Seitdem ist der Insulinrezeptor von vielen Arbeitsgruppen mit proteinchemischen Methoden beschrieben oder durch seine Bindungseigenschaften, die Spezifität, Sättigbarkeit und Reversibilität umfassen, charakterisiert worden. Detaillierte Übersichten über die bisher durchgeführten

Studien wurden von ROTH (1973), CUATRECASAS und HOLLENBERG (1976), KAHN (1981), GAMMELTOFT (1984) und CZECH (1985) veröffentlicht.

Insulin ist ein phylogenetisch altes Peptidhormon; es findet sich bei allen Vertebraten, insulinähnliche Hormone treten aber auch bei Evertebraten auf (STEINER 1977, TAGER 1976). Das aus einer A-Kette (21 Aminosäuren) und einer B-Kette (30 Aminosäuren) bestehende Insulinmolekül (Molekulargewicht Mensch: 5734, Schwein:5777) weist trotz seiner geringen Größe wesentliche strukturelle Merkmale komplexer globulärer Proteine auf. Neben einem hydrophoben Kern finden sich auch zwei vorwiegend hydrophobe Oberflächenbereiche, die wahrscheinlich die intermolekularen Wechselwirkungen vermitteln (BLUNDELL und HUMBEL 1980).
Die erste erfolgreiche Analyse der Kristallstruktur, die ein detailliertes dreidimensionales Bild vom Insulinmolekül lieferte, wurde anhand von rhomboedrischen 2 Zn Kristallen aus Schweineinsulin durchgeführt (BLUNDELL et al. 1972). Diese in Gegenwart von Zinkionen auftretende Kristallisationsform wird von Insulinhexameren, die aus 3 äquivalenten Dimeren zusammengesetzt sind, gebildet; sie stellt die Speicherform des Insulins in den Granula der ß-Zelle des Pankreas dar; es existieren aber auch andere kristalline Modifikationen (BLUNDELL et al. 1972, BLUNDELL und WOOD 1982).
Weder bei den basal im Blut auftretenden Insulinkonzentrationen ($4*10^{-11}$ - $2*10^{-10}$ mol Insulin/l)noch bei den im Anschluß an z.B. eine Glukosestimulation erhöhten Insulinkonzentrationen (peripher gem.: $5*10^{-10}$ mol/l; portal gem. $5*10^{-9}$ mol/l) (BLACKARD und NELSON 1970) sollte eine Dimerisierung von Insulin aufgrund der Assoziationskonstanten von $7,5*10^{5}$ l/mol im größeren Umfang auftreten; eine Hexamerenbildung ist bei jeder der angegebenen Konzentrationen unwahrscheinlich (BLUNDELL et al. 1972, POCKER und BISWAS 1981). Die im Kristall vorliegende charakteristische Tertiärstruktur bleibt allerdings bei dem

in Lösung vorliegenden Insulinmonomeren weitgehend erhalten (WOLLMER et al. 1980).
Der Rezeptorbindungsbereich konnte aufgeklärt werden, er umfaßt eine invariante Region auf der Oberfläche des Insulinmonomeren, die in der A-Kette von den Aminosäuren GLY-A1, GLN-A5, TYR-A19 und ASN-A21 und in der B-Kette von VAL-B12, TYR-B16, GLY-B23, PHE-B24, PHE-B25, und TYR-B26 gebildet wird, wobei die apolaren Aminosäuren der B-Kette auch an der Dimerenbildung beteiligt sind (PULLEN et al. 1976).

Der Insulinrezeptor ist ein Glykoprotein (Molekulargewicht: ~350000), das aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut ist, die ein symmetrisches Tetramer ß-α-α-ß aus durch Disulfidbrücken verknüpften Untereinheiten bilden.
Die α-Untereinheit (Molekulargewicht: ~135000), die über einen großen extrazellulären Bereich verfügt, scheint die insulinbindende Komponente darzustellen, während die ß-Untereinheit (Molekulargewicht: ~95000) eine insulinempfindliche Proteinkinasefunktion aufweist (CZECH 1985, KAHN 1985).
Nach Gefrierbruch wurde eine Partikelgröße von 10-30 nm für das elektronenoptisch dargestellte, affinitätsgereinigte Insulinrezeptor-Protein bestimmt, das in ein artifizielles Membransystem (Triton-X-114) eingebaut wurde (KOPP et al. 1985).
Die mit biochemischen Methoden erzielte Beschreibung des Insulinrezeptors wurde durch die Aufklärung der Primärstruktur mit Hilfe von c-DNA Klonen gestützt (ULLRICH et al. 1985, EBINA et al. 1985).
Bei den Zielzellen der Insulinwirkung liegt die aus Insulinbindungsexperimenten bestimmte Insulinrezeptorkonzentration in der Größenordnung von 10 Insulinrezeptoren/μm^2.

Während der erste und der letzte Schritt der Interaktion von Insulin mit einer Zelle, die Bindung an den plasmamembranständigen Rezeptor, bzw. die Modulation des Zellstoffwechsels, bekannt sind, ist die Übermittlung des Signals von der Plasmamembran zu den Organellen noch weitgehend ungeklärt.
In der Abbildung I.1. wurde versucht, die Interaktion von Insulin mit seinem Rezeptor und die sich daran anschließenden Ereignisse zu skizzieren. Das Schema beruht sowohl auf experimentellen Daten als auch auf Modellvorstellungen und stellt die derzeitige Arbeitshypothese dar. Es veranschaulicht, daß die Kompartimentierung des Rezeptors sowie Umverteilungsprozesse von freien und besetzten Rezeptoren Bedeutung für die Signalübertragung einerseits und für die Regulation des Rezeptors sowie für den Abbbau des Hormons andererseits haben können.

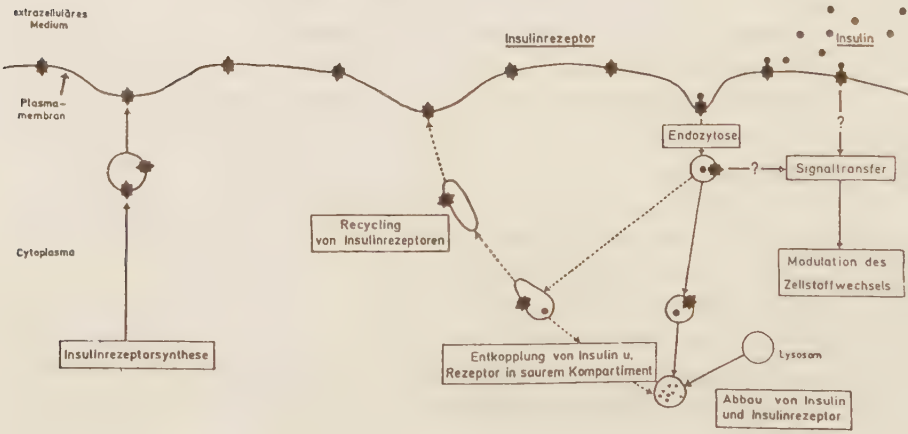


ABB. 1.1.
SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER INSULIN BZW. INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEX INTERAKTION MIT EINER ZELLE DES ZIELGEWEBES

Im folgenden werden einige der Konzepte zum Mechanismus des Signaltransfers vorgestellt.
Die Entdeckung des cyclo-AMPs und seiner Rolle in der biologischen Wirkung von Adrenalin und anderen Hormonen (SUTHERLAND et al. 1965) veranlaßte auch bei Insulin die Suche nach einem "second messenger".
Es wurden verschiedene Substanzen wie cyclo-AMP, cyclo-GMP, Ca^{2+}, Mg^{2+} und H_2O_2 in Betracht gezogen (CZECH 1977, KAHN 1979, DENTON et al. 1982).
Von den Arbeitsgruppen um LARNER und JARETT wurde die insulininduzierte Bildung eines oder mehrerer niedermolekularer Mediatoren mit "Glyko- oder Oligopeptidcharakter" vorgestellt (JARETT et al. 1982, CHENG und LARNER 1985).
WASNER und Mitarbeiter haben einen aus Prostaglandin E, Myo-Inositol und Phosphat aufgebauten "cyclo-AMP-Antagonisten" isoliert, dem ebenfalls Mediatorfunktion bei der Insulinwirkung zugeschrieben wird (WASNER 1975, 1980, 1981).
Einige dieser Faktoren rufen Effekte hervor, die mit der Insulinwirkung korrelierbar sind, aber keiner scheint der alleinige Mediator der Insulinwirkung zu sein.
Auch andere Modulationsmöglichkeiten wie die Veränderung des intrazellulären pH-Werts oder Membranhyperpolarisationen wurden vorgeschlagen (CZECH 1977, KAHN 1979 und DENTON 1982).

Ein weiteres Konzept, das den Mechanismus des Signaltransfers beschreiben soll, wurde von KASUGA und Mitarbeitern (1982 a & b) aus dem Nachweis der insulininduzierten Tyrosinkinasefunktion der ß-Untereinheit des Insulinrezeptors entwickelt. Durch eine Autophosphorylierung soll die Kinaseaktivität des Rezeptors stimuliert werden, sodaß andere zelluläre Substrate im Sinne der entsprechenden Insulinwirkung aktiviert werden können. Seitdem wurde die mit dem Insulin-Rezeptor-Komplex assoziierte Kinasefunktion von vielen Arbeitsgruppen beschrieben (COBB und ROSEN 1984, GAMMELTOFT und VAN OBBERGHEN 1986), aber die Vorstellung, daß damit ein Signaltransfer verknüpft ist, wurde auch kontrovers diskutiert (SIMPSON und HEDO 1984).

Die schnelle Aufnahme von Insulin in Gegenwart von Insulinrezeptoren und der Nachweis von Insulin und seinen Rezeptoren in den gleichen subzellulären Fraktionen führte zu der Annahme, daß Insulin gemeinsam mit seinem Rezeptor vermittels rezeptormediierter Endozytose, einem Prozess, der zuerst für den Transport von LDL*-Partikeln ins Zellinnere beschrieben wurde, in die Zelle eingeschleust wird (GOLDSTEIN et al. 1979, POSNER et al. 1981, WILLINGHAM und PASTAN 1980, 1984).
Die Bedeutung der rezeptormediierten Endozytose für die Insulinwirkung ist noch ungeklärt. Die Internalisierung von Insulin-Rezeptor-Komplexen dient einerseits dazu, gebundenes Hormon von der Zelloberfläche zu entfernen (Insulindegradation), andererseits könnte sie ein Mechanismus sein, durch den die Zellen eine vorübergehende Desensitivierung gegen überschießende Insulinkonzentrationen erreichen ("down-regulation"). Sie könnte aber auch eine Verstärkung der Insulinwirkung ermöglichen. Die Entdeckung von Endosomen mit neutralem und saurem pH-Wert führte zu dem Konzept, daß internalisiertes Insulin zunächst rezeptorgebunden in einem neutralen Endosom vorliegt. Erst im folgenden Schritt soll eine Dissoziation der Insulin-Rezeptor-Komplexe in einem sauren endosomalen Kompartiment stattfinden, sodaß Insulin dem lysosomalen Abbau zugeführt werden kann, während die Insulinrezeptoren entweder ebenfalls abgebaut werden, oder an die Zelloberfläche rezyklisieren können (BERGERON et al. 1985). Es wäre denkbar, daß durch die im neutralen Endosom vorliegenden Insulin-Rezeptor-Komplexe die Proteinkinase-aktivität oder die Bildung intrazellulärer Mediatoren auch bei bereits fallenden extrazellulären Hormonkonzentrationen eine gewisse Zeit aufrecht erhalten wird (BERGERON et al. 1985, KAHN 1985).
Während die Langzeiteffekte der biologischen Wirkung möglicherweise eine rezeptormediierte Endozytose voraussetzen, müssen die raschen Antworten , z.B. die Glukoseaufnahme, auf einem anderen Mechanismus beruhen.

* LDL = "low-density-lipoprotein"

SCHLESSINGER und seine Mitarbeiter beobachteten, daß sich als Folge der Interaktion von Insulin mit seinem Rezeptor, bzw. von anderen Polypeptidhormonen z.B. "epidermal-growth-factor", "nerve-growth-factor" oder Thyreotropin mit ihren jeweiligen Rezeptoren, Aggregate von ligandenbesetzten Rezeptoren auf der Zelloberfläche bilden (SCHLESSINGER et al. 1978, MAXFIELD et al. 1978, SHECHTER et al. 1979, SCHLESSINGER 1980, SCHLESSINGER et al. 1980, LEVI et al. 1980, AVIVI et al. 1982). Die Autoren zeigten mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierung, daß das Hormon an zunächst diffus verteilte, mobile Membranrezeptoren bindet. Die Hormon-Rezeptor-Komplexe bilden in einem temperaturabhängigen Schritt bei 23 und 37° C auf der Zelloberfläche innerhalb von 15 min sichtbare Makroaggregate ("cluster", "patches" oder "caps"), die, wie SCHLESSINGER abschätzt, aus mehr als 100 besetzten Rezeptoren bestehen, die in der Folge internalisiert werden (SCHLESSINGER et al. 1978, SCHLESSINGER 1980).

Aus der ligandeninduzierten Aggregatbildung wurde von SCHLESSINGER (1980) eine Hypothese zum Signaltransfer entwickelt. Ausgehend von der beobachtbaren, aber zeitlich nach den raschen Wirkungen des Insulins auftretenden Makroaggregat Bildung, postulierte SCHLESSINGER eine der sichtbaren "patch" Bildung vorangehende, fluoreszenztechnisch nicht nachweisbare Mikro-"cluster" Bildung, die bereits unmittelbar im Anschluß an die Insulinbindung erfolgen könnte. Es wäre denkbar, daß durch diese Mikroaggregate direkt oder durch Effektormoleküle die schnellen Wirkungen des Liganden hervorgerufen werden (SHECHTER et al. 1978, SCHLESSINGER et al. 1978, SCHLESSINGER 1980).

Einen weiteren, allerdings ebenfalls indirekten Hinweis auf die Bedeutung der ligandeninduzierten Rezeptoraggregation für die Insulinwirkung geben die Experimente von KAHN und seinen Mitarbeitern (1978).
In ihrer Studie wurde gezeigt, daß ein Insulinrezeptor-Anti-

körper an den Insulinrezeptor bindet und eine insulinähnliche Wirkung hervorruft, während das monovalente Fab'-Fragment zwar auch an den Rezeptor bindet, aber keine insulinähnliche Aktivität auslöst. Erst die Vernetzung der Fab'-Fragment-Rezeptor-Komplexe induziert eine dem Insulin analoge Wirkung.
Von der offensichtlich auf Vernetzung von Insulinrezeptoren durch den Antikörper beruhenden insulinähnlichen Wirkung wurde geschlossen, daß die Insulinbindung ähnliche Vorgänge induziert.

Im Gegensatz zum Konzept von SCHLESSINGER (1980) konnte die Gruppe um JARETT keine insulininduzierte Aggregatbildung nachweisen; sie fand vielmehr entweder zufällig verteilte Insulin-Rezeptor-Komplexe oder unabhängig von den Bindungsbedingungen kleine Gruppen von Rezeptoren (NELSON et al. 1978, JARETT et al. 1980, GERSHON et al. 1981).

I.2. DIE PROBLEMSTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Von der vorgestellten Kontroverse ausgehend soll die vorliegende Arbeit zur Klärung der Frage beitragen, ob, bzw. unter welchen Bedingungen eine insulininduzierte Aggregation von Insulin-Rezeptor-Komplexen auf der Oberfläche insulinbindender Zellen stattfindet, oder ob die Insulin-Rezeptor-Komplexe zufällig verteilt auf der Zelloberfläche vorliegen.
Die Gruppen, die bisher Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen auf Zelloberflächen untersucht haben, wählten unterschiedliche Tracer und, davon abhängig, unterschiedliche Detektionsmethoden (SCHLESSINGER et al. 1978 & 1980, JARETT et al. 1980); sie haben ihre Untersuchungen aber auch an unterschiedlichen Zellspezies durchgeführt.
Ausgehend davon, daß neben möglichen zellspezifischen Unterschieden experimentelle Artefakte zu den diskrepanten Ergebnissen geführt haben, wurde dem methodischen Zugang zur Darstellung der Hormon-Rezeptor-Komplex Verteilung besondere Bedeutung beigemessen.
Die Topographie der Insulin-Rezeptor-Komplexe in der Plasmamembran setzt einerseits eine morphologische Detektionsmethode mit hoher Auflösung und Empfindlichkeit voraus, andererseits kann nur ein Tracer verwendet werden, der dem nativen Insulin möglichst ähnlich ist. Der eingesetzte Tracer kann aber infolge der für die Detektion unerläßlichen Derivatisierung im Hinblick auf seine Bindungseigenschaften vom nativen Liganden abweichen. So sollte die Tracerqualität das ausschlaggebende Kriterium bei der Darstellung der Insulin-Rezeptor-Komplexe sein; durch die Wahl des Tracers wird aber auch die Detektionsmethode festgelegt.

SCHLESSINGER und Mitarbeiter verwendeten zwei fluoreszenzmarkierte Insuline; ein Rhodamin-Insulin und ein Kopplungsprodukt aus Insulin und α-Lactalbumin, das eine variable Anzahl an Rhodaminmolekülen aufwies (SCHLESSINGER et al. 1978, SHECHTER et al. 1978).

Das von der Arbeitsgruppe von JARETT verwendete monomere Ferritin-Insulin ist ein ultrastruktureller Marker für Insulinrezeptoren (JARETT et al. 1980, LYEN et al. 1983), es soll eine dem nativen Insulin vergleichbare Bindungs- und biologische Aktivität aufweisen (SMITH und JARETT 1982). Das große Ferritinmolekül (Ø 12 nm) könnte allerdings die Insulinbindung sterisch beeinflussen und so zu Fehlinterpretationen in der Verteilungsanalyse führen.
Neben diesen beiden Tracern könnte zur Verteilungsanalyse Gold-Insulin verwendet werden. Durch die elektronendichte Markierung lassen sich Insulin-Rezeptor-Komplexe im Transmissions- oder Rasterelektronenmikroskop darstellen. Bisher wurden allerdings nur Insulin-BSA*-Komplexe, an die kolloidales Gold gekoppelt war, eingesetzt (ACKERMANN und WOLKEN 1981, CUNNINGHAM et al. 1984). Hierbei erfolgte die Bindung mehrerer Insulinmoleküle an ein Goldpartikel, sodaß durch den Einsatz dieses potentiell multivalenten Liganden möglicherweise artifizielle Aggregate entstehen können.

Alle bisher aufgeführten Tracer sind, sofern sie nicht zusätzlich radioaktiv markiert sind, meßtechnisch schwer zu erfassen. Eine Quantifizierung der Insulinbindung wird dadurch erschwert.

Fast alle Bindungsstudien des Insulinrezeptors wurden mit 125I-markiertem Insulin durchgeführt, wobei eine potentiell mögliche hohe spezifische Radioaktivität auch Bindungsanalysen bei niedrigen, physiologischen Hormonkonzentrationen erlaubt.

Da Insulin vier potentiell jodierbare Tyrosinreste A14, A19, B16 und B26 enthält, kann 125I-Insulin bezüglich der Position des 125I-Isotops variieren.

* BSA = Rinderserumalbumin

Mit den Standardmethoden der Jodierung (Chloramin-T nach HUNTER und GREENWOOD 1962, bzw. Lactoperoxidase nach THORELL und JOHANSSON 1971) werden in Abhängigkeit von den Jodierungsbedingungen bis zu 80% der Radioaktivität in Tyrosin-A14 und der Rest vor allem in Tyrosin-A19 eingebaut (JØRGENSEN und LARSEN 1980, GLIEMANN et al. 1981, LINDE et al. 1981).
Bereits 1979 zeigten GLIEMANN und seine Mitarbeiter, daß der Substitutionsort des 125I im Insulinmolekül ausschlaggebend ist für die Bindung und die biologische Aktivität des Insulins. Allerdings wurde erst durch die Auftrennung der Jodierungsprodukte über die RP-HPLC eine vollständige Trennung der vier monojodierten Isomere möglich (WELINDER 1983 et al., FRANK et al. 1983). Während bei einem in Position A19 substituierten Produkt eine verminderte Aktivität vorliegt, weist MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin eine Bindungsaffinität und eine biologische Aktivität auf, die dem nativen Insulin vergleichbar ist (GLIEMANN et al. 1979).
Da das 125I-Isotop aufgrund seiner Zerfallseigenschaften auch für autoradiographische Analysen gut geeignet ist (KAYES et al. 1962), bot sich vor allem die Verwendung des MONO-125I-(TYR-A14)-Insulins als Tracer für die vorliegende Problemstellung an.
Als Methode zum Nachweis der Verteilung der Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Zelloberfläche wurde die quantitative, lichtmikroskopische Autoradiographie nach JUNGER (1979) bzw. JUNGER und BACHMANN (1980) ausgewählt.
Die Markierung des Insulins mit dem 125I-Isotop ermöglicht einerseits die Dokumentation der Insulinbindung in einer Zellpopulation durch Radioaktivitätsmessung im γ-counter und andererseits mit der von JUNGER (1979) beschriebenen autoradiographischen Technik den Nachweis der auf der Oberfläche von Einzelzellen lokalisierten radioaktiven Quellen (hier: 125I-Insulinmoleküle) im Zellausstrichpräparat.

Als Zellsystem, an dem die Verteilung der Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Zelloberfläche studiert werden sollte, wurden menschliche mononukleäre Leukozyten eingesetzt. Von dieser Mischpopulation, bestehend aus 80-90% Lymphozyten und 10-20% Monozyten, ist seit der Studie von SCHWARTZ und seinen Mitarbeitern (1975) bekannt, daß der Monozyt die eigentlich insulinbindende Spezies ist. Die Monozyten wurden ausgewählt, da sie eines der wenigen menschlichen insulinbindenden Zellsysteme darstellen, das leicht verfügbar ist.

Der Insulinrezeptor unterliegt als integrales Membranprotein dem Einfluß der Membranfluidität.
Das Membranmodell von SINGER und NICOLSON (1972), das "fluid-mosaic" Modell, beschreibt die Plasmamembran als eine Matrix, in der Zonen hoher Fluidität (Lipide) die verteilten Membranproteine umgeben. Wegen des engen Kontaktes zwischen Membranproteinen und Lipiden könnten demnach Veränderungen des physiologischen Zustandes der Lipide die Eigenschaften der Membranproteine, also auch des Insulinrezeptors, verändern.
Die Lipidzusammensetzung der Membran und die Temperatur beeinflussen die Membranfluidität wesentlich (NICOLSON et al. 1977). Änderungen der Inkubationstemperatur könnten demnach die Verteilung von Membrankomponenten oder ihren Einschleusungsvorgang ins Zellinnere verändern.
So wurde von SCHLESSINGER und seinen Mitarbeiter (1978, 1980) der Effekt der Temperaturerhöhung auf die "cluster" Bildung von Insulin- bzw. EGF*-Rezeptor-Komplexen beschrieben. Während nach einer 90 min Inkubation bei 4°C ein diffuses Fluoreszenzsignal beobachtet wurde, bildeten sich bei Inkubationstemperaturen von 23 und 37°C schnell Aggregate von Hormon-Rezeptor-Komplexen. Die "cluster" Bildung vollzog sich allerdings bei 37°C rascher als bei 23°C; eine 15 min Inkubation bei 37°C genügte, um deutlich sichtbare "patches" nachzuweisen (SCHLESSINGER et al. 1978, SHECHTER et al. 1978).

* EGF = "epidermal-growth-factor"

Auch die rezeptormediierte Endozytose unterliegt dem Einfluß Inkubationstemperatur; mit sinkender Temperatur nimmt sie ab, bis sie bei 4°C nicht mehr nachzuweisbar ist (GOLDSTEIN et al. 1979, STEINMAN et al. 1983).

Bei den hier vorgestellten Verteilungstudien der Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Monozytenoberfläche wurden drei verschiedene Inkubationstemperaturen eingesetzt. Bei 15°C sollten die Membranlipide unterhalb des Lipidumwandlungsbereichs vorliegen und eine verhältnismäßig starre Lipidmatrix bilden, während bei 25°C und bei der physiologischen Temperatur von 37°C eine hohe Membranfluidität zu erwarten ist.

Auch die Ligandenkonzentration kann für die Interaktion von Insulin mit seinem Rezeptor wesentlich sein. So konnten SCHLESSINGER und seine Mitarbeiter (1980) bei physiologischen Konzentrationen keine mikroskopisch sichtbaren "cluster" mit fluoreszenzmarkiertem Insulin nachweisen; sie schließen aber eine Mikro-"cluster" Bildung nicht aus. Sichtbare "caps" fanden sie erst im Konzentrationsbereich von 10^{-8} mol Insulin/l in dem auch das Phänomen der "down-regulation" der Insulinrezeptoren auftritt.
Andererseits fanden JARETT und seine Mitarbeiter auch bei niedrigeren Insulinkonzentrationen ($2\text{-}4*10^{-9}$ mol/l) zellspeziesabhängig kleine Gruppen von Rezeptoren (JARETT und SMITH 1977, LYEN et al. 1983).
Die Verteilung der Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Monozytenoberfläche wurde in zwei Insulinkonzentrationsbereichen untersucht. Die gewählten Konzentrationen von $5*10^{-10}$ bzw. 10^{-9} mol Insulin/l entsprechen den Insulinmengen, denen der Monozyt in der Blutzirkulation ausgesetzt wird.
Der Konzentrationsbereich um 10^{-8} mol Insulin/l stellt einen unphysiologisch hohen Bereich dar, bei dem aber die meisten Fluoreszenzmessungen durchgeführt wurden (SCHLESSINGER et al. 1978). Durch die Gegenüberstellung dieser Konzentrationsbe-

reiche sollte eine Abschätzung, ob bzw. in welcher Weise die Ligandenkonzentration die Hormon-Rezeptor-Komplex Verteilung beeinflußt, möglich sein.

Für die hier vorgestellten Verteilungsstudien der Insulin-Rezeptor-Komplexe standen zwei verschiedene 125I-Insuline zur Verfügung. Neben dem erst seit 1983 verfügbaren MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin, wurde zunächst auch RANDOM-markiertes Insulin, das bezüglich der Position des Jodatoms nicht definiert ist, für die Verteilungsanalysen eingesetzt.
Durch die Gegenüberstellung der vermittels quantitativer lichtmikroskopischer Autoradiographie dargestellten Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen, die sich mit den unterschiedlich jodierten Tracern erreichen lassen, sollte sich der mögliche Einfluß der Tracerqualität auf die Verteilungsform feststellen lassen.
Anhand der durch die Variation der Inkubationstemperatur und der Wahl von zwei Konzentrationsbereichen induzierten Verteilungsmuster sollte sich die unter physiologischen Bindungsbedingungen vorliegende Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auf der Zelloberfläche des gewählten Zellsystems, den Monozyten, beschreiben lassen.

II. M A T E R I A L

II.1. CHEMIKALIEN

RADIOCHEMIKALIEN:
MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin: 370 µCi/µg, NEN, Dreieich.
RANDOM-markiertes Insulin mit einer spezifischen Aktivität von 150-300 µCi/µg wurde von Frau Priv. Doz. Dr. E. Junger (biochemische Abteilung des Diabetes Forschungsinstituts) jodiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
INSULIN:
Actrapid^{R} (40 IE/ml), NOVO Industrie GmbH, Mainz.
CHEMIKALIEN:
Cacodylsäure (Kat.Nr. C-0250), Sigma, Taufkirchen; Glutaraldehyd (25%), Serva, Heidelberg; Gurr's Neutral Mounting Medium (n=1,5104), Deutsche Schwab Reagentien GmbH, Villmar-Aumenau; Hepes^{R}, Serva, Heidelberg; Liquemin^{R} Roche (5000 IE/ml Na-heparinat), Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen; Lymphoprep^{R}, Nyegaard & Co., Oslo; Nitrozellulose in Amylacetat (10%), Fullam Inc., Schenectady, N.Y.; Osmiumtetroxid, Serva, Heidelberg; Percoll^{TM}, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala; Rinderserumalbumin (BSA), Cohn Fraktion V, Serva, Heidelberg; Silikonöl AR 200 und AS 100, Wacker Chemie GmbH, München; Trypanblau, krist., Deutsche Schwab Reagentien GmbH, Villmar-Aumenau.
PHOTOCHEMIKALIEN:
Nuclear Research Emulsion L_4, Ilford, Basildon, Essex;
Mikrodol X, Kodak, Stuttgard;

Alle übrigen Chemikalien, die verwendet wurden, wiesen den Reinheitsgrad p.A. auf und wurden von der Firma Merck, Darmstadt, geliefert.

II.2. PUFFER

a) Hanks-Puffer (pH = 7,4, 280 mosmol/kg):

Zusammensetzung:

$CaCl_2 * 2\ H_2O$	1,26 * 10^{-3}	mol/l
$MgSO_4 * 7\ H_2O$	0,81 " "	"
KCl	5,36 " "	"
KH_2PO_4	0,44 " "	"
$Na_2HPO_4 * 2\ H_2O$	0,34 " "	"
$NaHCO_3$	4,17 " "	"
NaCl	136,89 " "	"
Glukose $* H_2O$	5,05 " "	"

b) Hanks-Puffer (pH = 7,4, 380 mosmol/kg):

wie a) Hanks-Puffer (pH = 7,4, 280 mosmol/kg) mit einem Zusatz von 0,054 mol NaCl/l.

c) Hepes^R-Puffer (pH = 7,4, 300 mosmol/kg):

Zusammensetzung:

Hepes^R (N-2-hydroxy-ethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	69,77 * 10^{-3}	mol/l
NaCl	83,69 " "	"
KCl	3,49 " "	"
$MgSO_4 * 7\ H_2O$	0,84 " "	"
Natriumacetat	10,46 " "	"
Glukose $* H_2O$	6,97 " "	"
EDTA	0,70 " "	"

II.3. GRADIENTENMEDIEN

a) Lymphoprep^{R} (ϱ = 1,077 g/ml) wurde unverdünnt eingesetzt. Pro Zentrifugenröhrchen wurden 30 ml Lymphoprep^{R} und 50 ml Blutgemisch (1 VT Vollblut und 1 VT Hanks-Puffer, pH = 7,4, 380 mosmol) eingesetzt.

b) Percoll^{TM} (ϱ = 1,130 $\pm$ 0,005 g/ml), Osmolalität: < 20 mosmol/kg H_2O) wurde verdünnt eingesetzt:

Lösung 1: 9 VT Percoll^{TM} und 1 VT NaCl (1,2 mol/l), (ϱ = 1,12 g/ml)
Lösung 2: 60 VT Lösung 1 und 40 VT Hanks-Puffer (a), (ϱ = 1,07 g/ml)
Lösung 3: 50 VT Lösung 1 und 50 VT Hanks-Puffer (a), (ϱ = 1,06 g/ml)
Lösung 4: 30 VT Lösung 1 und 10 VT Hanks-Puffer (a), (ϱ = 1,04 g/ml)

Alle Lösungen wurden auf pH 7,4 eingestellt und wiesen eine Osmolalität von 280 mosmol/kg auf.

Pro Zentrifugenröhrchen (Kontron^{R}: Zelluloseacetat 25,9 * 89 mm) wurden 3 ml Zellsuspension dem Gradienten bestehend aus 10 ml Lösung 4, 6 ml Lösung 3, 5 ml Lösung 2 und 4 ml Lösung 1 überschichtet.

II.4. WEITERE MEDIEN

Glutaraldehyd wurde als 2,5%-ige Lösung in 0,19 molarem Cacodylat-Puffer (pH=7,4, 280 mosmol/kg) verwendet, die Osmolalität betrug 550 mosmol/kg.

Osmiumtetroxid wurde als 2%-ige Lösung in 0,19 molarem Cacodylat-Puffer (pH=7,4, 280 mosmol/kg) verwendet, die Osmolalität betrug 350 mosmol/kg.

III. METHODEN

III.1. DIE ISOLATION DER MONONUKLEÄREN LEUKOZYTEN

Für Insulinbindungsstudien am Monozyten wird aus präparationstechnischen Gründen zumeist eine Mischpopulation aus mononukleären Leukozyten verwendet. Für die hier vorgestellten Untersuchungen wurden mononukleäre Leukozyten aus dem Venenblut männlicher Spender der Blutgruppe A Rh pos. isoliert, das um eine Koagulation zu verhindern, mit dem Antikoagulans Heparin versehen wurde.
Um die für die Bindungsstudien erforderlichen Zellmengen (30-50*10^6 Monozyten) zu erhalten, war der Einsatz von 400 ml Vollblut pro Experiment notwendig.
Die Abtrennung der mononukleären Leukozyten von den übrigen Blutzellen folgte unter Einsatz von zwei Zentrifugationsschritten im wesentlichen den von BØYUM (1968 und 1976) vorgegebenen Bedingungen (siehe Tabelle III.1.).
Bei der ersten Zentrifugation wird verdünntes Vollblut dem Zentrifugationsmedium Lymphoprep^R überschichtet, das sich aus einer Komponente hoher Dichte, dem jodhaltigen Natriummetrizoat und einem polymeren Zucker, Ficoll, zusammensetzt.

Der polymere Zucker gewährleistet eine rasche Aggregation der Erythrozyten. Die aggregierten Erythrozyten und die Granulozyten sedimentieren aufgrund ihrer höheren Dichte im Verlauf der Zentrifugation, während die mononukleären Leukozyten und die Thrombozyten an der Phasengrenze zwischen Zentrifugationsmedium und Blutserum eine Bande bilden.
Um die Thrombozyten von den mononukleären Leukozyten abzutrennen, war eine weitere Gradientenzentrifugation über einen diskontinuierlichen Percoll^{TM}-Gradienten erforderlich (vergl. Tabelle III.1.).
Durch die Zentrifugation bildete sich im Bereich der Dichte 1,04 g/ml eine breite Bande bestehend aus Thrombozyten, zwischen den Dichten 1,06 g/ml und 1,07 g/ml fand sich eine deut-

liche Bande bestehend aus Lymphozyten und Monozyten (bei einigen Isolationen waren zwei Banden zu erkennen) und an der Phasengrenze der Dichten 1,07 g/ml und 1,125 g/ml bildeten die restlichen Erythrozyten und die kleinen Lymphozyten eine Bande.

Die Bande der mononukleären Leukozyten wurde durch Austropfen fraktioniert und mit isotonem Hanks-Puffer (pH = 7,4, 280 mosmol/kg, 1% BSA) durch Sedimentation gewaschen. Das Zellpellet wurde in Bindungspuffer (Krebs-Ringer-Hepes^{R}-Puffer, pH=7,8, 300 mosmol/kg, 1% BSA) aufgenommen und anschließend jeweils noch zweimal in diesem Puffer sedimentiert (900*g, 5 min) und resuspendiert.

Vor dem Einsatz der mononukleären Leukozyten in ein Bindungsexperiment wurden die Zellkonzentration und der Monozytengehalt mittels Neubauer-Zählkammer im Lichtmikroskop bei 250-facher Vergrößerung bestimmt.

Die Monozyten ließen sich aufgrund einer charakteristischen Eigenschaft von den Lymphozyten differenzieren.

Während die Lymphozyten als kugelige Zellen (Ø 5-10 µm) vorlagen, spreiteten die in Suspension ebenfalls kugeligen Monozyten (Ø 7-12 µm in Suspension) auf der Glasunterlage der Zählkammer zu flachen Scheibchen mit einem mittleren Durchmesser von 17 µm, wobei der Zellkern als geringe Erhöhung in der Mitte der Zelle zu erkennen war (Abb.III.1.).

Im Mittel wurden $500*10^{6}$ mononukleäre Leukozyten aus 400 ml Blut isoliert, der Monozytengehalt variierte von Präparation zu Präparation und lag im Mittel bei 14%.

Erythrozyten- und Granulozytenverunreinigungen lagen bei allen Präparationen unter 1%. Das Verhältnis der kleinen Thrombozyten (Ø 3 µm) zu den mononukleären Leukozyten betrug in Abhängigkeit von der Präparation 0,5-1 : 1.

Die Viabilität der Zellpopulation wurde mit einer Vitalfärbung, dem Trypanblautest (TENNANT, 1964) überprüft und lag nach der Präparation bei 99%.

TABELLE III.1.

DIE ISOLATION MONONUKLEÄRER LEUKOZYTEN AUS HEPARINISIERTEM, MENSCHLICHEM VOLLBLUT (Blutgruppe A, Rh pos.)

1 VT HEPARINISIERTES VOLLBLUT
\+ 1 VT HANKS-PUFFER (pH = 7,4, 380 mosmol/kg)
AUF LYMPHOPREP^{R} AUFTRAGEN

↓ 400 * g, 25 min

1 VT BANDE (LYMPHOZYTEN, MONOZYTEN, THROMBOZYTEN)
\+ 1 VT HANKS-PUFFER (pH = 7,4, 280 mosmol/kg, 1% BSA, 0,1% Heparin)

↓ Sedimentation bei 900 * g, 10 min

SUSPENDIEREN DES SEDIMENTS IN HANKS-PUFFER (pH = 7,4, 280 mosmol/kg, 1% BSA, 0,1% Heparin)
AUFTRAGEN AUF DEN PERCOLL^{TM}-GRADIENTEN

↓ 400 * g, 5 min

FRAKTIONIERUNG DURCH AUSTROPFEN, SAMMELN DER MONONUKLEÄREN LEUKOZYTEN
1 VT BANDE
\+ 1 VT HANKS-PUFFER (pH = 7,4, 280 mosmol/kg, 1% BSA)

↓ 1 * Waschen durch Sedimentation 900 * g, 10 min

SUSPENDIEREN DES PELLETS IN HEPES^{R}-PUFFER (pH = 7,8, 300 mosmol/kg, 1% BSA)

↓ 2 * Waschen durch Sedimentation 900 * g, 10 min

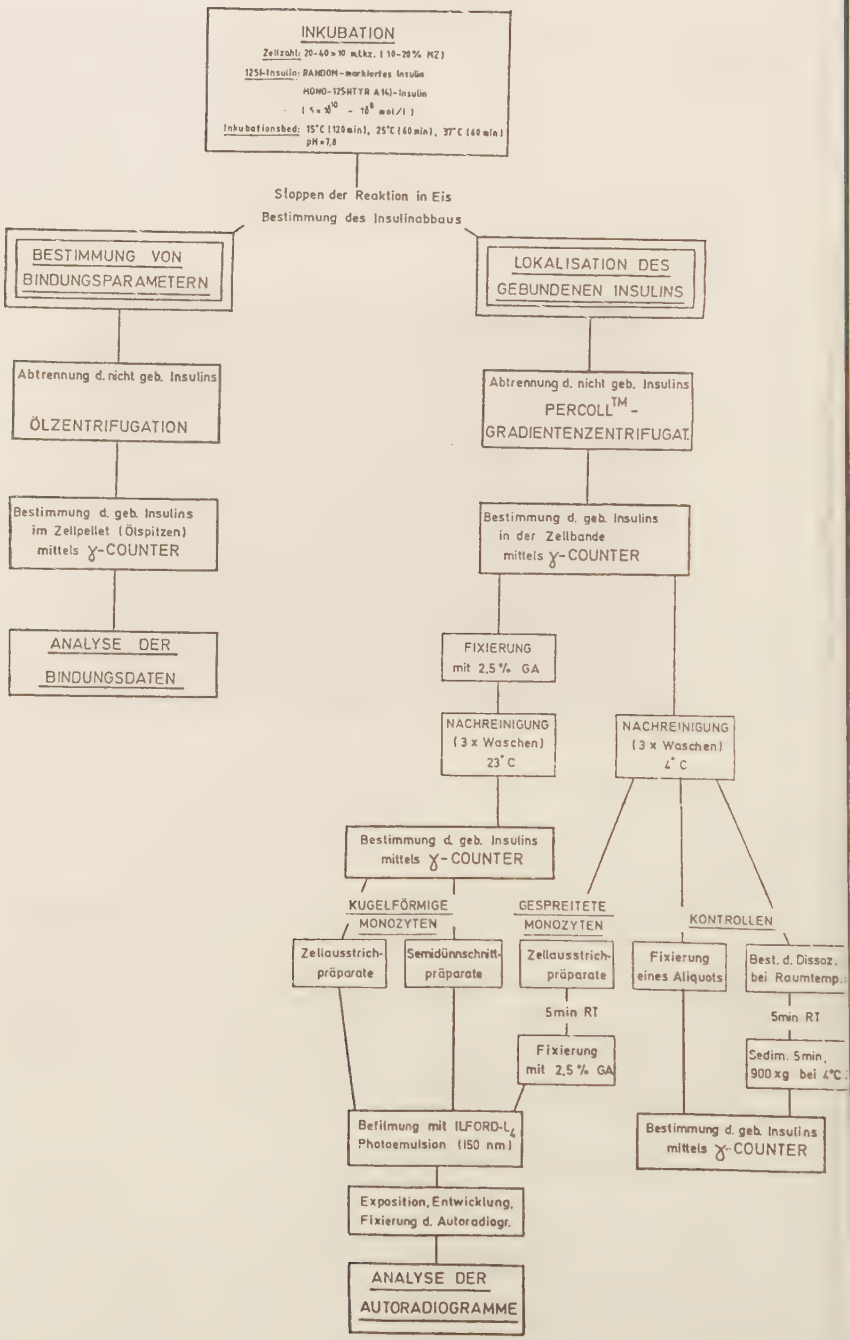
SUSPENDIEREN DES PELLETS IN HEPES^{R}-PUFFER (pH = 7,8, 300 mosmol/kg, 1% BSA)

20 µm

ABB.III.1.

DIE ZUSAMMENSETZUNG DER ZELLPOPULATION NACH DEM PERCOLL^{TM}-GRADIENTEN

Der gespreitete Monozyt (MZ) hebt sich deutlich von den ihn umgebenden Lymphozyten (LZ) ab. Während Verunreinigungen der Zellpräparation durch Thrombozyten (TZ) häufig auftreten, kommen Erythrozyten (ERY) selten vor. (Abbildung im Interferenzkontrast).


INKUBATION
Zellzahl: 20-40 x 10 m.Lkz. (10-20 % MZ)
125I-Insulin: RANDOM-markiertes Insulin
MONO-125-HTYR A14)-Insulin
(1 = 10^10 - 10^8 mol/l)
Inkubationsbed: 15°C (120 min), 25°C (60 min), 37°C (60 min)
pH = 7,8
Stoppen der Reaktion in Eis
Bestimmung des Insulinabbaus
BESTIMMUNG VON BINDUNGSPARAMETERN
LOKALISATION DES GEBUNDENEN INSULINS
Abtrennung d. nicht geb. Insulins
ÖLZENTRIFUGATION
Abtrennung d. nicht geb. Insulins
PERCOLL™ - GRADIENTENZENTRIFUGAT.
Bestimmung d. geb. Insulins im Zellpellet (Ölspitzen) mittels γ-COUNTER
Bestimmung d. geb. Insulins in der Zellbande mittels γ-COUNTER
ANALYSE DER BINDUNGSDATEN
FIXIERUNG mit 2,5 % GA
NACHREINIGUNG (3 x Waschen) 23° C
NACHREINIGUNG (3 x Waschen) 4° C
Bestimmung d. geb. Insulins mittels γ-COUNTER
KUGELFÖRMIGE MONOZYTEN
GESPREITETE MONOZYTEN
KONTROLLEN
Zellausstrich-präparate
Semidünnschnitt-präparate
Zellausstrich-präparate
Fixierung eines Aliquots
Best. d. Dissoz. bei Raumtemp.
5min RT
Fixierung mit 2,5 % GA
5min RT
Sedim. 5min, 900xg bei 4°C
Befilmung mit ILFORD-L4 Photoemulsion (150 nm)
Bestimmung d. geb. Insulins mittels γ-COUNTER
Exposition, Entwicklung, Fixierung d. Autoradiogr.
ANALYSE DER AUTORADIOGRAMME

III.2. INSULINBINDUNG DER MONONUKLEÄREN LEUKOZYTEN

III. 2.1. INKUBATIONSBEDINGUNGEN

Das Hauptgewicht der Studie liegt auf dem morphologischen Nachweis des zelloberflächengebundenen 125I-Insulins. Der methodische Ansatz, die lichtmikroskopische Autoradiographie, war auf eine quantitative Lokalisation radioaktiv markierter Insulin-Rezeptor-Komplexe ausgerichtet. Im Zusammenhang damit wurde auch eine Bilanzierung der morphologischen Befunde mit den in der Biochemie üblichen Isotopenmessungen angestrebt. Da zwar unterschiedliche Detektionsmethoden aber derselbe Tracer eingesetzt wurden, konnten jeweils identische Bindungsansätze verwendet werden.
Bei einem Ansatzvolumen von 1,5 ml (Eppendorf^{R}-Röhrchen) wurden 20 - 40*10^{6} mononukleäre Leukozyten in Krebs-Ringer-Hepes^{R}-Puffer (pH = 7,8, 300 mosmol/kg, 1% BSA) mit 125I-Insulin einer spezifischen Aktivität von 150 - 350 µCi/µg bei Inkubationstemperaturen von 15°C, 25°C und 37°C inkubiert. Der Zellkonzentrationsbereich wurde so gewählt, daß eine lineare Abhängigkeit der Insulinbindung von der Zellkonzentration vorlag (Diplomarbeit GIESEN 1981). Die entsprechenden Inkubationszeiten und die eingesetzten Insulinkonzentrationen werden im Ergebnisteil aufgeführt.
Während der Inkubation in einem thermostatisierten Wasserbad wurden die Zellen durch langsames Drehen in Suspension gehalten.
Zur Differenzierung des spezifisch am Rezeptor gebundenen Anteils an 125I-Insulin und des unspezifisch an die Zellen assoziierten Traceranteils wurde in Parallelansätzen neben der Bestimmung der "Totalbindung", also der gesamten Menge an 125I-Insulin, die nach der Abtrennung des freien Insulins rezeptorgebunden und zellassoziiert vorlag, die "unspezifische Bindung" durch einen Überschuß an nativem Insulin (10^{-6} mol Actrapid^{R}/l) bestimmt. Obwohl diese Differenzierung zwischen Totalbindung und unspezifischer Bindung kritisch

diskutiert wird, gilt der Kompetitionsansatz als bisher beste Näherung zur Abschätzung des unspezifisch assoziierten Insulinanteils.
Nach dem Ende der Inkubation wurden die Bindungsansätze für 5 min in Eis abgekühlt. Um eine weitere Reaktion des Insulins mit seinem Rezeptor zu unterbinden, wurden alle nachfolgenden Schritte bei 4°C durchgeführt, sodaß Assoziations- und Dissoziationsprozesse des Insulins verhindert wurden.

III.2.2. DIE QUANTIFIZIERUNG DER 125I-INSULINBRUCHSTÜCKE IM EINGESETZEN TRACER UND NACH DER INKUBATION

Der Anteil an 125I-Insulinbruchstücken wurde sowohl vor dem Einsatz des Tracers in ein Bindungsexperiment als auch nach beendeter Inkubation durch Präzipitation mit Trichloressigsäure (TCA) bestimmt.
Ein Aliquot der eingesetzten Lösung bzw. des Inkubationsgemischs wurde mit einem zweifachen Überschuß an TCA (10%) versetzt, 30 min bei 4°C belassen und anschließend in der Beckman^{R}-Microfuge Model B (12000 rpm, 1 min) zentrifugiert.
Alle Proteine, so auch das verhältnismäßig kleine Insulin, wurden gefällt, während niedermolekulare 125I-Bruchstücke einschließlich 125I-Tyrosin und 125I im Überstand verblieben.
Das Verhältnis von präzipitierbarer und im Überstand befindlicher Radioaktivität war zum einem beim eingesetzten Tracer ein Maß für seine Qualität, zum anderen nach erfolgter Inkubation ein Maß für den Einfluß des zell- oder inkubationsbedingten Abbaus.

III.2.3. DIE ABTRENNUNG DES NICHT GEBUNDENEN INSULINS

Der gebundene Anteil des Tracers macht üblicherweise bei Insulinbindungsstudien nur einen Bruchteil des freien Tracers aus, sodaß zur exakten Erfassung dieses Bindungsanteils eine quantitative Abtrennung mit einer adäquaten Trenntechnik erfolgen muß. Die gewählte Methode sollte außerdem gewährleisten, daß die Dissoziation während der Trennung vernachlässigbar ist. Je nach den Anforderungen, die an das Experiment gestellt wurden, sind zwei unterschiedliche Trenntechniken verwendet worden.

2.3.1. Die Ölzentrifugationstechnik

Bei der Bestimmung der Affinitätskonstanten K_a, der Rezeptorkonzentration R_0, des pH-Optimums der Insulinbindung oder des Zeitverlaufs der Insulinbindung fielen große Probenmengen (30-40 Einzelproben) an. Das erforderte eine möglichst einfache und rasche Trenntechnik. Die Ölzentrifugationsmethode erlaubte das schnelle Auftragen eines Aliquots der Zellsuspension (200 ul) auf ein Silikonölgemisch (1VT Wacker^R-Silikonöl AR 200, ϱ =1,04, Viskosität = 200 cSt, 1VT Wacker^R-Silikonöl AS 100, ϱ =1,00, Viskosität = 100 cSt). Die gefüllten Polypropylen-Mikroteströhrchen (Beckman^R, 550 µl Volumen) wurden in einer Beckman^R Microfuge Model B bei 12000 rpm für 30 sec zentrifugiert. Durch die hochtourige Zentrifugation sammelten sich die Zellen als fest gepackte Pellets in der Spitze der Zentrifugationsröhrchen, die abgeschnitten und im γ-counter auf die enthaltene Radioaktivität überprüft wurden. Das nicht gebundene Insulin verblieb getrennt vom Zellpellet durch die hydrophobe Phase im Überstand. Von jedem Inkubationsansatz wurden je 200 µl Zellsuspension auf 6 mit Silikonöl gefüllte Mikroteströhrchen aufgegeben.

III.2.3.2. Die Percoll^{TM}-Gradientenzentrifugationstechnik

Da bei den autoradiographischen Experimenten mit höheren Zellkonzentrationen im Inkubationsansatz (etwa $40*10^6$ mononukleäre Leukozyten/Ansatz) gearbeitet wurde, waren die Parametervariationen je Zellpräparation limitiert. An einer Zellpräparation wurden entweder zwei verschiedene Insulinkonzentrationen oder zwei verschiedene Inkubationstemperaturen getestet, sodaß die Probenmenge bei der Durchführung eines autoradiographischen Experiments mit 8 Inkubationsansätzen verhältnismäßig gering war.
An die verwendete Trenntechnik wurde allerdings die Forderung gestellt, daß die Zellen anders als bei der Ölzentrifugationstechnik in einem weiterverarbeitbaren Zustand verbleiben.
Zur Abtrennung des nicht gebundenen Insulins wurde daher bei einem autoradiographischen Experiment die zeitaufwendigere, aber für die Zellen schonende Zentrifugation über einen Percoll^{TM}-Zweistufengradienten durchgeführt.
In Zelluloseacetat-Röhrchen (Kontron^{R}, 14 * 95 mm) wurden 5 ml einer isotonen Percoll^{TM}-Lösung niedriger Dichte (ϱ=1,04 g/ml, pH = 7,4, 280 mosmol/kg) mit 4 ml einer Percoll^{TM}-Lösung hoher Dichte (ϱ =1,125 g/ml,pH = 7,4, 280 mosmol/kg) unterschichtet. Der auf 4°C äquilibrierte Gradient wurde mit 1,3 ml Zellsuspension überschichtet und für 5 min bei 400*g an der Phasengrenze der beiden Percoll^{TM}-Lösungen zentrifugiert. Während das nicht gebundene Insulin im Überstand verblieb, bildeten die mononukleären Leukozyten eine Bande an der Phasengrenze. Sie wurden durch Austropfen fraktioniert und mit Hanks-Puffer (pH 7,4, 280 mosmol/kg) auf ein Volumen von 6 ml aufgefüllt. Ein Aliquot der Zellbande (1ml) wurde mit 0,5 ml 2,5% Glutaraldehyd (in 0,19 mol Cacodylatpuffer/l) versetzt. Aus der Radioaktivitätsmessung des Aliquots im γ-counter und der Zellkonzentrationsbestimmung in der Neubauer-Zählkammer wurde die vorliegende Insulinbindung abgeschätzt. Der Monozytengehalt wurde in einem nicht fixierten Aliquot bestimmt.

Handhabungsbedingt wird ein Teil des freien 125I-Insulins von den Zellen mitgerissen. Dieser Anteil läßt sich durch mehrfaches Sedimentieren selbst nach bereits erfolgter Fixierung auswaschen; er beträgt bezogen auf den im Inkubationsansatz vorliegenden Liganden im Mittel weniger als 1%.

Die Percoll™-Gradientenzentrifugation und die Ölzentrifugationsmethode wurden in ihren Ausbeuten verglichen; es zeigte sich, daß der Einsatz der unterschiedlichen Trenntechniken keinen Einfluß auf die Höhe der spezifischen Insulinbindung hatte.

III.2.4. DIE BESTIMMUNG DER AFFINITÄTSKONSTANTEN K_a UND DER REZEPTORKONZENTRATION R_0

Die Interaktion des Insulins mit seinem Rezeptor wird durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben.

$$K_d = \frac{[I] * [R]}{[IR]}$$

Durch die Dissoziationskonstante K_d werden die Konzentration an freiem Insulin (I), an nicht besetztem Rezeptor (R) und an Insulin-Rezeptor-Komplexen (IR) in einer nicht linearen Beziehung verknüpft. Der Reziprokwert der Dissoziationskonstanten K_d, die Affinitätskonstante K_a gilt als Maß für die Stärke der Bindung.

Zur Bestimmung der Affinitätskonstanten K_a und der Rezeptorkonzentration R_0 wurden in der hier vorgestellten Arbeit zwei experimentelle Varianten verwendet. Zum einem wurden Verdrängungsexperimente durchgeführt, bei denen einem konstanten Anteil an radioaktiv markiertem Tracer steigende Konzentrationen an nativem Insulin zugefügt wurden, zum anderen wurden Bindungsexperimente durchgeführt, bei denen der radioaktiv markierte Tracer in steigenden Konzentrationen in das Experiment eingesetzt wurde. Die Bindungsexperimente erfordern daher, die bei der jeweiligen Insulinkonzentration auftretende unspezifische Bindung in Parallelproben mit einem Überschuß an nativem Insulin mitzubestimmen.

Bei beiden Experimentarten ist eine direkte Bestimmung der Affinitätskonstanten K_a und der Rezeptorkonzentration R_0 nicht möglich. Aus dem Grenzwert gegen hohe Insulinkonzentrationen läßt sich R_0, aus dem Grenzwert gegen niedrige Insulinkonzentrationen läßt sich K_a abschätzen.

Eine der häufig verwendeten Methoden zur Bestimmung dieser Konstanten ist die Auftragung der Bindungsdaten nach SCATCHARD (1949). Hierbei wird das Verhältnis von gebundenem zu freiem

Liganden (B/F) als Funktion der Konzentration an gebundenem Liganden (B) aufgetragen. Bei einer einheitlichen Klasse von Rezeptoren liegt eine Gerade vor. Die Rezeptorkonzentration R_0 ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse, die Steigung der Geraden entspricht der negativen Affinitätskonstanten K_a. Falls unterschiedliche Klassen von Rezeptoren oder kooperatives Bindungsverhalten vorliegen, ist der SCATCHARD-Plot gekrümmt.
Bereits DERANLEAU (1969) beschrieb den Einfluß experimenteller Fehler bei der Bestimmung der Bindungsparameter aus dem SCATCHARD-Plot. Bei einem konstanten prozentualen Meßfehler nimmt die Unsicherheit bei der Bestimmung des gebundenen Liganden (B) gegen hohe Hormonkonzentrationen zu. Da dieser Parameter die x-Achse des SCATCHARD-Plots bildet, sind vor allem Aussagen über eventuell vorliegende Kooperativitäten oder niederaffine Rezeptorklassen mit beträchtlichen Fehlern behaftet.

Seit einiger Zeit werden numerische Verfahren, denen exakte mathematische Modelle für Liganden-Bindungssysteme zugrunde liegen, favorisiert. Die Ergebnisse der Bindungsanalysen werden unter Verwendung von statistisch zuverlässigen, nichtlinearen Kurvenanpassungsalgorithmen mit dem physiko-chemischen Modell verglichen (FELDMAN 1972, RODBARD und FELDMAN 1975, MUNSON und RODBARD 1980, MUNSON 1983).
Die in dieser Arbeit vorgestellten Bindungsanalysen wurden nach dem nicht-linearen Regressionsverfahren von PETERS und PINGOUD (1979 und 1982) ausgewertet, das die gemessenen Bindungsdaten mit der theoretischen Bindungsisotherme vergleicht. Die Analyse der Bindungsdaten war unter Vorgabe eines ein- oder zweiklassigen Bindungsmodells möglich, die unterschiedlich gute Anpassung an das jeweilige Modell wurde statistisch abgesichert.

III.3. LOKALISATION DES 125I-INSULINS AUF DER ZELLOBERFLÄCHE

Da die autoradiographische Technik die experimentelle Grundlage der hier vorgelegten Verteilungsstudien bildet, soll das Prinzip kurz erläutert werden.
Im Vergleich zu anderen Isotopen bietet die Verwendung von 125I unter Berücksichtigung einer bestimmten Probengeometrie eine günstige autoradiographische Empfindlichkeit und gleichzeitig ein gutes Auflösungsvermögen (FERTUCK und SALPETER 1974, SALPETER 1978).
125I zerfällt mit einer Halbwertszeit von 60 Tagen (ATKINS 1969, ERTL et al. 1970) unter Aussendung von γ-Strahlung und verschiedenen Auger- und Interkonversionselektronen (FORBERG et al. 1964). Unter den gewählten Bedingungen tragen nur die Elektronen, nicht aber die γ-Strahlung zum autoradiographischen Signal bei (JUNGER und BACHMANN 1980).
Die Elektronen lassen sich entsprechend ihrer Energien in drei Bereiche unterteilen (Tabelle III.2.).
Im Prinzip können alle von der Strahlquelle emittierten Elektronen, die die Photoschicht erreichen, ein Signal verursachen. Die gewünschte Information über die Zahl und die Verteilung der Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Zelloberfläche wird aber nur erzielt, wenn sichergestellt ist, daß der Anteil der Strahlung von dem der Photoschicht anliegenden Teil der Zelloberfläche signifikant höher ist, als Strahlung aus anderen Bereichen der Zelle.
Elektronen mit Energien unter 0,5 keV tragen zum autoradiographischen Signal nicht bei, da sie wegen ihrer geringen Reichweite selbst aus Gebieten, die der Photoschicht eng anliegen, die Photoemulsion nicht erreichen.
Unter den gewählten Bedingungen umfassen die 3-4 keV Elektronen mit einer mittleren Reichweite von 300 nm 80-85% der registrierbaren Elektronen (CHARLTON und BOOZ 1981, COLE 1969). In Folge ihrer geringen Reichweite können niederenergetische Elektronen die Photoemulsion nur erreichen, wenn sie aus Gebieten der Zelloberfläche stammen, die der Photoschicht eng

anliegen. Somit übertragen nur diese Elektronen die gewünschte Ortsinformation, sie werden außerdem mit höherer Empfindlichkeit registriert (BACHMANN und SALPETER 1967, FERTUCK und SALPETER 1974).
Die höherenergetischen 23-35 keV Elektronen können wegen der großen mittleren Reichweite (15 µm) von jedem Teil der Zelle aus die Photoschicht erreichen. Der Abschätzung des Anteils an höherenergetischen Elektronen in den Autoradiogrammen von Zellausstrichpräparaten kommt daher eine besondere Bedeutung zu. Diese Elektronen übermitteln keine Information über den Ort der Strahlquelle. So können sie sich, wenn ihre Beteiligung am Gesamtsignal zunimmt, störend auf die Analyse der Ortsverteilung auswirken. Mit einem zunehmenden Beitrag der höherenergetischen Elektronen ist vor allem dann zu rechnen, wenn neben der Bindung auf der Zelloberfläche ein Teil des Tracers internalisiert wurde. Im Zellausstrichpräparat ist der Anteil an niederenergetischen Elektronen aus zellinternen Bereichen vernachlässigbar, während die 23-35 keV Elektronen aufgrund ihrer Reichweite auch aus dem Zellinnern die Photoschicht erreichen können.
Die Empfindlichkeit der verwendeteten Photoschicht für die jeweiligen Elektronen konnte anhand eines Testpräparats bestimmt werden (SEMMLER und JUNGER 1986).
Die autoradiographische Empfindlichkeit ist definiert als der Kehrwert aus den Zerfällen, die im Mittel ein Silberkorn verursachen. Ein praktisches Maß für die Empfindlichkeit ist die Effizienz (%); die Anzahl Silberkörner pro Anzahl Zerfälle multipliziert mit 100.
Als Testpräparat für die autoradiographische Empfindlichkeit unter den gewählten Bedingungen wurden 125I-BSA*-Schichten eingesetzt (SEMMLER und JUNGER 1986).
Bei einer 35 nm dicken 125I-BSA*-Schicht und einer Kollodiumzwischenschicht von 20 nm werden bei Strahlungsdosen über

* BSA = Rinderserumalbumin

0,3 Zerfällen/μm^2 70% aller Zerfälle registriert. Eine Erhöhung der Dicke der Zwischenschicht auf 500 nm bei konstanter Dicke der radioaktiven Schicht (35 nm) führt dazu, daß alle niederenergetischen Elektronen absorbiert werden, sodaß das verbleibende Signal auf die höherenergetischen Elektronen zurückzuführen ist; es wird mit einer Effizienz von 10-20% registriert.
Die angegebenen Effizienzen werden bei allen Autoradiogrammen von Zellausstrichpräparaten verwendet, um aus der Anzahl Silberkörner auf die Anzahl der sie verursachenden Zerfälle zu schließen.
Auf die Veränderung der autoradiographischen Empfindlichkeit mit zunehmender Dicke der radioaktiven Schicht und auf das Problem der autoradiographischen Auflösung wird im Abschnitt III.4.2.(Seite 44) eingegangen.

TABELLE III.2.
ENERGIEBEREICHE UND REICHWEITEN DER 125I-ELEKTRONEN

keV	Reichweite	proz. Anteil
< 0,5	< 20 nm	85%
0,5- 1	20- 60 nm	2%
3- 4	200-400 nm	11%
23-35	10- 20 µm	2%

Die Reichweiten beziehen sich auf ein Medium der Dichte 1g/ml.

III.3.1. DIE HERSTELLUNG DER ZELLAUSSTRICHPRÄPARATE

Für die mit quantitativer Autoradiographie erstellten Verteilungsstudien der Insulin-Rezeptor-Komplexe in der Plasmamembran des Monozyten wurden zwei verschiedene Monozytenpräparate verwendet (vergl. Abb. III.2.a & b).

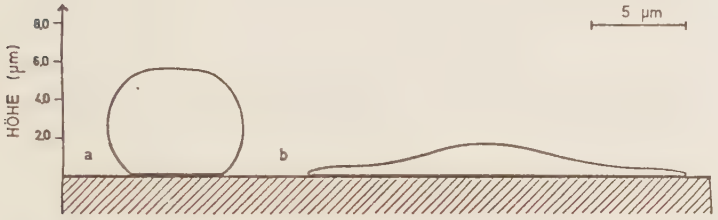


ABB.III.2.
SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES KUGELFÖRMIGEN (a)
UND DES GESPREITETEN MONOZYTEN (b)

a) kugelförmige Monozyten

Die in Suspension annähernd kugelige Gestalt des Monozyten (Abb.III.2.a) läßt sich durch Fixierung erhalten. Nach dem Abtrennen des nicht gebundenen Insulins im Percoll^{TM}-Gradienten wurde ein Teil der ausgetropften Zellbande in 2,5% Glutaraldehyd fixiert (siehe Seite 26). Nach 1 h Fixierungsdauer wurde die Zellsuspension in Hanks-Puffer (pH 7,4, 280 mosmol/kg) dreimal gewaschen (Sedimentation bei 900*g, 5 min) das letzte Sediment wurde in Hanks-Puffer (pH 7,4, 280 mosmol /kg), dem 0,1% BSA zugefügt wurde, aufgenommen.
An einem Aliquot dieser Zellsuspension wurde die jeweilige Insulinbindung durch die Überprüfen der Zellzahl und der enthaltenen Radioaktivität bestimmt. Die restliche Zellsuspension wurde zur Herstellung der Zellausstrichpräparate verwendet, indem je 30 µl Aliquots (1-2*10^6 Monozyten/ml) auf das untere Drittel von Glasobjektträgern homogen aufgetragen und an Luft getrocknet wurden. Da die angetrockneten

Zellen gut auf der Glasoberfläche hafteten, war ein nachfolgendes Auswaschen des Albumins und der Puffersalze ohne große Zellverluste möglich.

b) gespreitete Monozyten

Die statistischen Verteilungsanalysen wurden an gespreiteten Monozyten (Abb. III.2.b) durchgeführt.
Aus der in Suspension kleinen, kugeligen Zelle (Ø 7-12 µm) entsteht, vermittelt durch den Kontakt mit einer Glasoberfläche, ein flaches Scheibchen, dessen mittlerer Durchmesser bei 17 µm lag.
Da nur ein vitaler, nicht fixierter Monozyt diese Formveränderung eingehen kann, wurde die Zellbande nach dem Abtrennen des nicht gebundenen Insulins im Percoll^{TM}-Zweistufengradienten dreimal mit 4°C kaltem Hanks-Puffer(pH 7,4, 280 mosmol/kg) gewaschen, das letzte Sediment wurde in Hanks-Puffer, dem 0,1% BSA zugefügt war, suspendiert. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert und wie beschrieben (siehe Seite 26) auf die entsprechende Insulinbindung überprüft.
Ein Vergleich der Höhe der Insulinbindung dieser Zellpräparation mit den direkt nach dem Austropfen aus dem Percoll^{TM}-Gradienten fixierten Aliquots zeigte, daß die unterschiedlichen Präparationsbedingungen keinen Einfluß auf die Höhe der Insulinbindung hatten.
30 µl Zellsuspension (2-4*10^6 Monozyten/ml) wurden auf Glasobjektträgern ausgestrichen und mit einem Deckglas im Abstand von 0,1 mm bedeckt. Da der Monozyt bei 4°C nicht in seiner typischen Form spreitet, wurden die Zellausstrichpräparate für 5 min bei 23°C belassen und anschließend durch Auftropfen von 2,5% Glutaraldehyd fixiert. Nach einer Stunde Fixation wurden die Zellausstriche mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Die so behandelten Präparate erwiesen sich als frei von Puffersalzen, BSA und Glutaraldehyd, dessen quantitatives Auswaschen zur Vermeidung von Chemographie notwendig ist.

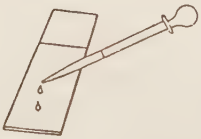
Kontrollmessungen haben ergeben, daß bei 4°C keine Dissoziation erfolgt, innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur kann die Dissoziation des gebundenen Insulins aber nicht vernachlässigt werden. Daher wurden 0,5 ml Aliquots der verwendeten Zellsuspension von 4°C auf 23°C erwärmt und für 5 min bei Raumtemperatur belassen. Durch Auffüllen von 5 ml 4°C kaltem Hanks-Puffer (pH 7,4, 280 mosmol/kg) wurde der Dissoziationsvorgang beendet. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (300*g, 5 min), das Zellpellet wurde in 500 µl Hanks-Puffer resuspendiert und mit 500 µl 2,5% Glutaraldehyd fixiert. Im Vergleich zu den nach dreimaligem Waschen sofort fixierten Zellen ergab sich der Anteil an dissoziiertem Tracer.

III.3.2. BEFILMUNG DER ZELLAUSSTRICHPRÄPARATE MIT DER ILFORD-L_4 PHOTOEMULSION

Um Zellausstrichpräparate mit einer homogenen Ilford-L_4 Photoemulsion zu bedecken, wurde eine Stripping-Film Technik verwendet (JUNGER 1979, JUNGER und BACHMANN 1980).
Vor der Befilmung der Ausstrichpräparate wird bei dieser Methode die Photoemulsion auf eine dünne Kollodiumträgerschicht aufgebracht.
Glasobjektträger wurden durch Eintauchen in eine 0,1% Kollodiumlösung in Butylacetat mit einem 15-20 nm (bzw. 500 nm) dicken Kollodiumfilm beschichtet. Die Schichtdicke wurde interferometrisch bestimmt.
Die verwendete Ilford-L_4 Photoemulsion wurde in der Dunkelkammer bei Rotlicht 1:6 mit Wasser verdünnt, bei 45°C geschmolzen und bei 32°C äquilibriert.
Das benetzte leicht überlappende Monolayer der Ilford-L_4 Photoemulsion weist eine Schichtdicke von 150 nm auf; diese Schichtdicke erzeugt im reflektierten weißen Licht eine purpurne Interferenzfarbe (BACHMANN und SALPETER 1965). Die Kon-

zentration der Emulsion wurde solange variiert, bis der größte Teil der mit Photoemulsion bedeckten Fläche der Kontrollobjektträger die gewünschte Interferenzfarbe aufwies.
Der Stripping-Film wurde auf Wasser abflottiert. Durch Eintauchen der Zellausstrichpräparate wurde der Stripping-Film so aufgebracht, daß die Photoemulsion durch die inerte Kollodium-Zwischenschicht vor einem direkten Kontakt mit der Zelloberfläche geschützt war (Abb.III.3).

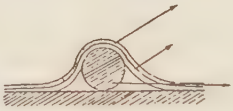
Eintauchen des Objektträgers in 0,15% Kollodium



Auftropfen der Emulsion

Abflottieren des Stripping-Films auf eine Wasseroberfläche

Befilmung eines Zellausstrichpräparats



Präparatgeometrie

ABB.III.3.
BEFILMUNG DER ZELLAUSSTRICHPRÄPARATE

III.3.3. EXPOSITION, ENTWICKLUNG UND FIXIERUNG DER AUTORADIOGRAMME

Unter Berücksichtigung der experimentell ermittelten Empfindlichkeit der Methode wurde die Expositionszeit so gewählt, daß eine Strahlungsdosis von mindestens 0,3 Zerfällen/μm^2 vorlag. Die Berechnung der Strahlungsdosis erfolgte nach folgender Formel:

$$(1) \qquad D_x = D_0 * \frac{1440 * t^{1/2}}{\ln 2} \left[1 - e^{-\ln 2 * t/t^{1/2}} \right]$$

D_x = Strahlungsdosis: Zerfälle/Flächeneinheit (Zelloberfläche oder μm^2)
D_0 = Insulinbindung : dpm/Flächeneinheit (Zelle oder μm^2)
t = Expositionszeit in Tagen
$t^{1/2}$ = Halbwertszeit des verwendeten Isotops in Tagen

Die hier vorgestellten Autoradiogramme wurden 15-150 Tage bei 4°C exponiert. Die Entwicklung der Autoradiogramme erfolgte bei 20°C in Mikrodol X für 3 min. Die Entwicklungsprozess wurde in 3% Essigsäure gestoppt und anschließend in einer Lösung aus 20% Natriumthiosulfat und 2,5% Kaliumbisulfit fixiert. Die Präparate wurden anschließend mehrfach gewässert und an Luft getrocknet.

III.3.4 DIE AUSWERTUNG DER ZELLAUSSTRICHAUTORADIOGRAMME

Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte im Lichtmikroskop unter Verwendung von Ölimmersionsobjektiven mit 100-facher Objektivvergrößerung. Die luftgetrockneten Autoradiogramme wurden in wasserunlöslichem, aushärtendem Gurr's Neutral Mounting Medium eingebettet, das durch einen hohen Brechungsindex (n = 1,5104) neben einer Kontrastverminderung der Zellkonturen eine zufriedenstellende Darstellung der Silberkörner ermöglichte (JUNGER 1979).
Die Auswertung der Autoradiogramme von kugelförmigen Monozyten erfolgte zum überwiegenden Teil mit einer Kombination aus Auf- und Durchlicht im Hellfeld.
Ein Teil der Autoradiogramme der kugelförmigen und alle Autoradiogramme der gespreiteten Monozyten wurden im Interferenzkontrast ausgewertet.
Bei beiden Beleuchtungsarten lassen sich die Silberkörner eindeutig identifizieren, die Darstellung der Zellstruktur, vor allem der zarten Plasmasäume gespreiteter Monozyten, ist aber nur im Interferenzkontrast möglich.

TABELLE III.3.
DURCHMESSER UND HÖHE MONONUKLEÄRER LEUKOZYTEN IN UNTERSCHIEDLICHEN MEDIEN

	kugelförmige Lymphozyten/Monozyten		gespreitete Monozyten	
	Durchmesser (µm)	Höhe (µm)	Durchmesser (µm)	Höhe (µm)
isotones Medium:	6,6 ± 0,5*	n.b.	17,7 ± 7,5	n.b.
Lufttrocknung :	4,9 ± 0,5*	n.b.	n.b.	n.b.
Gurrs N.M.M. :	4,9 ± 0,5*	5,4+	16,9 ± 7,7	1,5++

* aus JUNGER (1979), Gurr's N.M.M. = Gurr's Neutral Mounting Medium,
+ nur auf Monozyten bezogen, ++ auf "flache" Monozyten bezogen.
Die Zellen wurden jeweils nach Lufttrocknung in Gurr's N.M.M. eingebettet.

Bei der Abbildung der dreidimensionalen räumlichen Objekte ist der geringen Schärfentiefe des Lichtmikroskops Rechnung zu tragen.
Die in Suspension fixierten kugelförmigen Monozyten sind Ellipsoide, mit einem mittleren Durchmesser von 7-12 µm und einer mittleren Höhe von 5 µm (vergl. Tabelle III.3.). Um die obere Zellhälfte abbilden zu können, sind 3-4 Fokusebenen erforderlich (Abb. III.2a und 4).

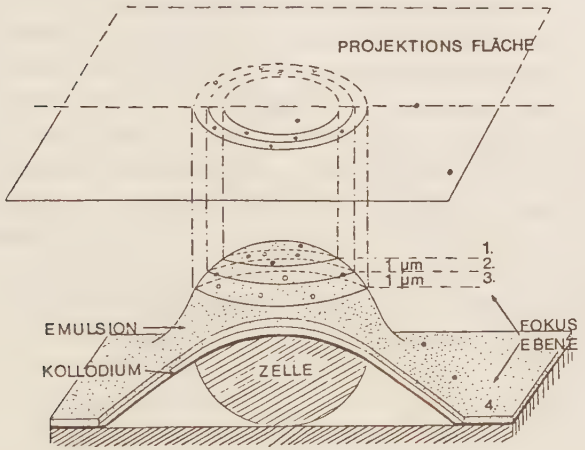


ABB.III.4.
DIE AUTORADIOGRAPHISCHE AUSWERTUNG DER ZELLAUSSTRICHPRÄPARATE

Vier Fokusebenen und die zugehörige Superposition sind an einer von Photoemulsion bedeckten Zelle schematisch dargestellt (aus: JUNGER und BACHMANN 1980).

Die gespreiteten Monozyten weisen einen mittleren Durchmesser von 17 µm auf und sind über der Kernregion etwa 1-2 µm hoch (vergl. Abb. III.2b). Zur Abbildung der oberen Zellhälfte sind 1-3 Fokusebenen erforderlich.
Während der Schrumpfungsprozess durch die Luftrocknung bei der kugelförmigen Zelle erheblich ist, ändert sich die Größe der gespreiteten Zelle durch diese Prozedur nicht (vergl. Tabelle III.3.).

Um die Silberkorndichte und die Silberkornverteilung an der Einzelzelle zu bestimmen, wurden die für die Auswertung notwendigen Fokusebenen photographiert. Die Negative wurden durch einen Diaprojektor mit einer 5000-fachen Endvergrößerung auf eine Arbeitsplatte projeziert, sodaß Superpositionen der Fokusebenen erstellt werden konnten. Die ermittelten Werte ließen sich durch die Bestimmung der Projektionsfläche auf eine Einheitsfläche normieren. Bei kugelförmigen Monozyten wurde eine mittlere Bezugsfläche von 100 μm^2 verwendet, wobei bei der Berechnung der Zellhälfte die Höhe der Monozyten berücksichtigt wurde. Bei den relativ flachen gespreiteten Monozyten wurde unter Vernachlässigung der minimalen Erhöhung über dem Kern eine Bezugsfläche von 200 μm^2 gewählt.

III.3.5. DIE BERECHNUNG DER KONZENTRATION AN INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEXEN AUS DER SILBERKORNDICHTE

Aus der Anzahl der Silberkörner auf einer gegebenen Fläche kann unter Berücksichtigung der 125I-Zerfallscharakteristik mit den Formeln (2) und (3) die Menge an 125I-Insulinmolekülen berechnet werden.
Bei den hier vorgestellten Autoradiogrammen von Zellausstrichpräparaten wurden jeweils in Parallelproben sowohl das durch nieder- und höherenergetische Elektronen verursachte Gesamtsignal (20 nm Kollodiumzwischenschicht) als auch das Signal der 23-35 keV Elektronen (500 nm dicken Kollodiumzwischenschicht) bestimmt.

$$(2) \quad D_0 = \frac{SK * d}{\frac{1440 * t^{1/2}}{\ln 2} * \left[1 - e^{-\ln 2 * t/t^{1/2}} \right]}$$

D_0 = Insulinbindung: dpm/Flächeneinheit (Zelle oder μm^2)
SK = Anzahl Silberkörner/Flächeneinheit (Zelle oder μm^2)
d = 1 / Empfindlichkeit
t = Expositionszeit
$t^{1/2}$ = Halbwertszeit des verwendeten Isotops in Tagen

$$(3) \quad M = \frac{D_0 * N}{\text{spez. Akt.}}$$

D_0 = Insulinbindung: dpm/Flächeneinheit (Zelle oder μm^2)
M = gebundene Tracermoleküle
N = Loschmidtsche Zahl ($6{,}03 * 10^{23}$)
spez. Akt. = spezifische Aktivität des verwendeten Isotops (dpm/mol)

Um den Anteil der Tracermoleküle, der auf der Zelloberfläche lokalisiert war, zu bestimmen, wurde der Anteil der höherenergetischen Elektronen vom Gesamtsignal subtrahiert. Die verbleibenden, auf niederenergetische Elektronen zurückzuführenden Silberkörner wurden unter Verwendung der Formeln (2) und (3) und einer Effizienz von 50% (70% Effizienz des Gesamtsignals - 20% Effizienz der höherenergetischen Elektronen, siehe Seite 30) in Insulinmoleküle umgerechnet.
Aus dem Ansatz der Totalbindung wurden jeweils 100 oder 200 Monozyten (zwischen 3000 und 9000 Silberkörner) ausgewertet, die Bestimmung der unspezifischen Bindung und des auf höherenergetische Elektronen zurückzuführenden Signals wurde je nach Größe des Signals an 200-300 Monozyten (100-600 Silberkörner) durchgeführt. Zur autoradiographischen Bestimmung der Insulinbindung von Lymphozyten wurden ebenfalls 200-300 Einzelzellen (100-600 Silberkörner) pro Ansatz ausgewertet. Bei den Lymphozyten und der unspezifischen Bindung der Monozyten wurden keine Präparate mit einer 500 nm dicken Kollodiumzwischenschicht ausgewertet.

III.4. QUANTIFIZIERUNG DES INTERNALISIERTEN ANTEILS AN 125I-INSULIN

Der Nachweis des vermittels Endozytose in das Zellinnere geschleusten Insulins wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden vorgenommen.

III.4.1. DIE BESTIMMUNG DES INTERNALISIERTEN ANTEILS AN 125I-INSULIN DURCH ANSÄUERN DES UMGEBENDEN MEDIUMS

Von HAIGLER et al. (1980) wurde beschrieben, daß die kurze Inkubation einer Zellsuspension in saurem Medium (pH 2,5) bei 4°C eine Differenzierung zwischen membranständigem und internalisiertem Tracer erlaubte. Bei diesem pH-Wert soll der gesamte zelloberflächengebundene Ligand innerhalb von 5-10 min dissoziieren. Radioaktivität, die an den Zellen verbleibt, soll auf den Anteil an internalisiertem Liganden zurückzuführen sein (CARO et al. 1982).

Mononukleäre Leukozyten wurden bei 15°C, 25°C und 37°C mit 125I-Insulin ($5 * 10^{-10}$ mol/l) 2h bzw. 1h inkubiert.
Nach Abkühlung in Eis und Abtrennung des freien Insulins im Percoll^{TM}-Zweistufengradienten wurde das dreimal gewaschene Zellpellet (1ml) bei 4°C mit einer sauren Lösung (5ml) versetzt.
Der Einfuß von zwei Medien unterschiedlicher Osmolalität wurde geprüft. Zum einen wurde die von HAIGLER et al. (1980) verwendete 0,2 molare Essigsäure (mit 0,5 mol NaCl/l, pH 3,0, 1080 mosmol/kg), zum anderen ein isotoner Hepes^{R}-Puffer (pH 3,0, 300 mosmol/kg) eingesetzt.
Nach einer Säurebehandlung von 5 min in Hepes^{R}-Puffer (pH 3,0, 300 mosmol/kg) und einmaligem Sedimentieren der Zellsuspension wurde die Radioaktivität im Überstand und im Zellpellet bestimmt.

Parallel zu dieser Prozedur wurde der Erhaltungsgrad der mononukleären Leukozyten über einen Zeitraum von bis zu 30 min Säureeinwirkung mit der Trypanblau-Vitalfärbung (TENNANT 1964) bestimmt. Der morphologische Zustand der jeweiligen Zellsuspensionen wurde zusätzlich an in Epoxidharz eingebetteten Aliquots im Elektronenmikroskop untersucht.

III.4.2. DIE BESTIMMUNG DES INTERNALISIERTEN ANTEILS AN 125I-INSULIN MITTELS AUTORADIOGRAPHIE VON SEMIDÜNNSCHNITTEN

Eine weitere Möglichkeit internalisiertes 125I-Insulin zu bestimmen, bietet die quantitative lichtmikroskopische Autoradiographie von Semidünnschnitten.
Nach erfolgter Bindung und Abtrennung des freien Insulins wurde zu diesem Zweck eine Zellsuspensionen kugelförmiger Monozyten nach 1h Fixierungsdauer dreimal in 0,19 mol Cacodylat-Puffer/l (pH 7,4, 280 mosmol/l) gewaschen (900 *g, 5 min). Es folgte eine 1h Nachfixierung in 2% Osmiumtetroxid (in 0,19 mol/l Cacodylat-Puffer, pH 7,4, Gesamtlösung: 350 mosmol/kg). Im Anschluß an mehrere Waschvorgänge wurde das letzte Zellpellet in 2% Agar eingerührt. Nach dem Gelieren der Agarlösung wurden kleine Agarblöckchen präpariert, durch Alkoholreihen aufsteigender Alkoholkonzentration entwässert und in Epoxidharz nach SPURR (1969) eingebettet. Von den polymerisierten Blöckchen wurden Semidünnschnitte angefertigt und auf Glasobjektträger überführt. Die mit Toluidinblau gefärbten Schnitte wurden wie die Zellaustrichpräparate befilmt, exponiert und entwickelt (siehe Abschnitt III.3.3. und III.3.4.).

Vor der Einbettung der Schnitte in Gurr's Neutral Mounting Medium wurde die Schnittdicke der Semidünnschnitte interferometrisch bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Schnitte einer Dicke von 0,5 $\pm$ 0.03 µm verwendet.

Die Auswertung dieser Autoradiogramme erfolgte im Lichtmikroskop im Mischlicht bei 125-facher Objektivvergrößerung. Pro auszuwertendem Zellschnitt wurden zwei Aufnahmen erstellt. Die Registrierung der Silberkörner erfolgte im Auflicht bei geschlossener Kondensorblende, während die Zellkonturen bei geöffneter Blende im Mischlicht deutlicher hervortraten. Es wurden Superpositionen angefertigt, sodaß die Silberkörner dem darunterliegenden Kompartiment zugeordnet werden können.

Bei der Auswertung der Autoradiogramme von Semidünnschnitten mußte das autoradiographische Auflösungsvermögen berücksichtigt werden. In Abhängigkeit von der Strahlungsenergie des verwendeten Isotops, der Probengeometrie und dem photographischen Prozess, kann ein radioaktiver Zerfall überall innerhalb eines charakteristischen Abstands von der Strahlquelle ein Silberkorn induzieren (SALPETER et al. 1978). Somit muß ein Silberkorn über einer bestimmten Zellorganelle nicht notwendigerweise von einem radioaktiven Zerfall in dieser Organelle verursacht worden sein. Die Aufgabe bei der Auswertung der Autoradiogramme ist, den "wahrscheinlichsten" Ort des Zerfalls zu ermitteln. Dies gelingt nicht mit der nötigen Sicherheit für ein einzelnes Silberkorn aber unter Anwendung statistischer Methoden für die gesamte Population an Silberkörnern.
Von verschiedenen Arbeitsgruppen (BLACKETT und PARRY 1973 & 1977, SALPETER et al. 1978, DOWNS und WILLIAMS 1978) wurden Analyseverfahren vorgestellt, die alle von der zu erwartenden Kornverteilung um Strahlquellen mit definierter Geometrie, z.B. um eine Linien- oder Punktquelle, ausgehen.
Die charakteristische Größe ist die Halbwertsdistanz (HD) (Linienquelle) oder der Halbwertskreis (HR) (Punktquelle), die die Fläche um eine Strahlquelle definiert, innerhalb derer mit 50% Wahrscheinlichkeit ein Silberkorn liegt (SALPETER et al. 1969). Die Halbwertsdistanz beträgt für eine 125I-Linienquelle in 0,5 µm Schnitten 0,25 µm (WILLIAMS et al. 1983).

Die Auswertung der hier vorgestellten Autoradiogramme an Semidünnschnitten erfolgte nach der Methode von DOWNS und WILLIAMS (1978).
Die Auswertung wurde auf einer Kreisfläche von 254 μm^2 vorgenommen. Der im Kernbereich angeschnittene Monozyt (mittlere Zellfläche 55 μm^2) wurde in der Mitte der Fläche positioniert. Folgende Kompartimente wurden definiert; der Bereich des Einbettungsmittels E, der Bereich der Plasmamembran P und der Bereich des Cytoplasmas I. Der Plasmamembranregion wurde ein schmales Band zugeordnet, dessen mittlere Breite der doppelten Halbwertsdistanz (HD=0,25 μm) entsprach (JUNGER et al. 1986).

Durch Auflegen einer Transparentmaske (Abb.III.5.) auf die auszuwertende Fläche wurden über den entsprechenden Zellschnitten hypothetische Strahlquellen in regelmäßigen Abständen verteilt. Jeder Strahlquelle sind in zufälliger Richtung sechs Punkte, an denen ein Silberkorn entstehen könnte, zugeordnet. Die vorliegenden Abstände zwischen den hypothetischen Strahlquellen und den potentiellen Silberkörnern sowie die statistischen Häufigkeiten leiteten sich aus der idealisierten Funktion von SALPETER und Mitarbeitern (1977) für die Silberkornverteilung um eine Punktquelle unter Berücksichtigung des Auflösungsvermögens für 125I im Semidünnschnitt (WILLIAMS et al. 1983) ab.
Durch die Zuordnung der hypothetischen Strahlquellen und möglichen Silberkörner zu den unterliegenden Kompartimenten E, P und I wurde eine "crossfire"-Matrix erstellen, die die statistisch zu erwartende Silberkornverteilung ergibt.
Die im Autoradiogramm vorliegenden Silberkörner wurden den drei Kompartimenten zugeordnet, wobei die Silberkörner in der Plasmamembranregion mit Hilfe eines Kreises (r = 1 HD) lokalisiert wurden. Der Kreismittelpunkt wurde an die in der Superposition eingezeichnete Zellgrenze angelegt, falls ein Silberkorn innerhalb dieses Kreises lag, wurde es der Plasmamembran zugezählt.
Anhand der "crossfire"-Matrix wurden die im Autoradiogramm

beobachteten Silberkorndichten pro Kompartiment gewichtet. Daraus ergab sich die wahrscheinlichste Verteilung der Strahlquellen, aus der die Insulinmoleküle pro Kompartimentvolumen berechnet wurden.

Die Empfindlichkeit, die bei Autoradiogrammen von Semidünnschnitten vorliegt, wurde mit einer homogenen radioaktiven 125I-BSA-Schicht einer den Semidünnschnitten vergleichbaren Schichtdicke (500 nm) bestimmt (SEMMLER und JUNGER 1986). Die Effizienz nimmt mit zunehmender Dicke der radioaktiven Schicht ab, da die niederenergetischen Elektronen aufgrund ihrer geringen Reichweite in Abhängigkeit vom Ort des 125I-Zerfalls absorbiert werden. Sie beträgt bei 0,5 µm dicken Semidünnschnitten 30% (SEMMLER und JUNGER 1986).

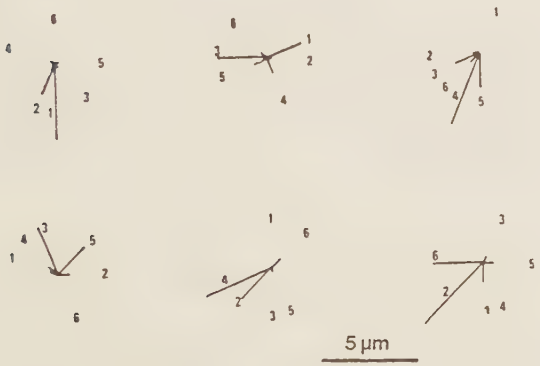


ABB.III.5.
AUSSCHNITT AUS DER TRANSPARENTMASKE ZUR BESTIMMUNG DER "CROSSFIRE"-MATRIX

III.5. VERTEILUNGSSTUDIEN DER INSULIN-REZEPTOR KOMPLEXE AUF DER ZELLOBERFLÄCHE VON MONOZYTEN

Flächige oder räumliche Verteilungsmuster lassen sich mit verschiedenen Methoden beschreiben. Um eine Population in ihrem Bereich zu untersuchen, werden vor allem Bestimmungen an Quadratrastern, sowie Abstandsmessungen vorgenommen. Die räumlichen Muster werden auf ihre Zufälligkeit getestet, indem man als Nullhypothese einen Poisson-Prozess unterlegt.

III.5.1. DIE ABSTANDSBESTIMMUNG ZWISCHEN NÄCHSTEN NACHBARN

Die Beurteilung der Verteilung von Objektabständen hat sich gerade bei kleinen Auswertungsflächen und verhältnismäßig geringer Objektzahl bewährt.
Die hier angewendete Analyse der Abstände zwischen einzelnen Silberkörnern, bzw. Insulinbindungsstellen auf der Zelloberfläche von Monozyten beruht auf einem von Herrn Dipl.-Phys. M. Neugebauer (Institut für Med. Statistik, Dokumentation und Datenverarbeitung, Universität Bonn) in Anlehnung an das Verfahren von RIPLEY (1977) und DIGGLE (1978 und 1979) entwickelten Auswertungsprogramm.

Zur Bestimmung der Silberkorn-Koordinaten wurde um die Projektionsfläche der Monozyten ein Quadrat so angeordnet, daß der größte Teil der Zelloberfläche in diesem Quadrat lag. So wurden die meisten vorliegenden Silberkörner erfaßt, zellfreie Bereiche aber möglichst ausgeschlossen.
Die Koordinaten der Silberkörner wurden mit Hilfe eines Digitizers vermessen. Zur Normierung der Koordinaten wurden die Seitenlängen der unterschiedlich großen Quadrate jeweils auf 1 bezogen.
Für die Abstandsverteilung wurde eine kumulative Dichtefunktion K(t) gebildet,die wie folgt definiert ist.

$$\lambda^2 * K(t) = E$$

Diese Funktion gibt die erwartete Anzahl geordneter Paare distinkter Punkte (E) an, die weniger als der Abstand t voneinander entfernt sind. Die Intensität λ beschreibt die erwartete Anzahl von Punkten (N) pro Einheitsfläche.
Wird die Zählfläche durch eine Einheitsfläche beschrieben, so ist eine Abschätzung der Dichtefunktion dadurch gegeben, daß jedem geordneten Paar von Punkten (x,y) ein Gewichtsfaktor k(x,y) zugeordnet wird.

$$\lambda^2 \hat{K}(t) = \sum_{\text{geord. Paare } (x,y) \text{ mit } d(x,y) \leq t} k(x,y)\, N^{-2}$$

Der Gewichtsfaktor k(x,y) nimmt eine Korrektur des Fehlers vor, der an den Rändern der Zählfläche auftritt. Dieser Faktor ist definiert als der Reziprokwert aus dem Umfang des Kreises um x mit dem Radius t, der innerhalb der Zählfläche liegt.
In die Betrachtung wurden nicht alle vorliegenden Abstände einbezogen, t wurde auf 0,3 begrenzt. Dieser Wert ergab sich daraus, daß "cluster" Prozesse, die sich durch eine Anhäufung von sehr kleinen Abständen auszeichnen, entdeckt werden sollten, sodaß größere Abstände vernachlässigbar waren.
Sofern Punkte zufällig auf einer Zählfläche verteilt vorliegen, ist die empirische kumulative Dichtefunktion ihrer Abstände proportional zur betrachteten Kreisfläche mit dem Radius t.

$$K(t) = \pi * t^2$$

Die Schwankungen um diese theoretische Funktion konnten analytisch nicht angegeben werden. Statt dessen wurde mit Hilfe der Monte Carlo Technik (HOPE 1968, BESAG und DIGGLE 1977) ein simuliertes Stichprobenverfahren durchgeführt. Die tatsächliche Gesamtheit (hier die Silberkorndichte pro Einheitsfläche) wurde durch ein stochastisches "Simulationsmodell" ersetzt. Vermittels Zufallszahlen wurden Stichproben aus der theoretischen Gesamtheit entnommen, bis es möglich war bei einer gegebenen Silberkorndichte eine zuverlässige obere und

untere Grenze für die Funktion K(t) anzugeben. Hierbei wurde ein α von 0,04 vorgegeben, sodaß nur 4% der simulierten Werte über den ermittelten Grenzen lagen.
Die Beurteilung der empirischen Abstandverteilungen wurde an den graphischen Darstellungen der zugehörigen kumulativen Dichtefunktion und der entsprechenden theoretischen Funktion mit ihren jeweiligen Grenzen für eine zufällige Verteilung vorgenommen.
Einige weitere Parameter unterstützten die Auswertung.

1. Der Parameter c:

$$c = \sum_{i=1}^{n} y_i$$

Der Parameter c bezieht sich auf einen von CLARK und EVANS (1954) vorgeschlagenen Test. Bei der vorgestellten Auswertung ist c definiert als die Summe der Abstände y_i eines jeden Punktes in der Einheitsfläche zum nächsten Nachbarn innerhalb der durch die Monte Carlo Simulation vorgegebenen Schranken. Falls c den durch die Simulationen vorgegebenen unteren oder oberen Grenzwert bei einem α von 0,04 überschreitet, wird die empirische Verteilung als nicht zufällig angesehen.

2. Das Supremum:

$$s = \sup_{t \leq t_0 = 0,25} \left| \frac{\hat{K}(t)}{\pi} - t \right|$$

Das Supremum beschreibt den größten Abstand der empirischen Dichtefunktion von der theoretischen Funktion. Dieser Wert wurde mit der größten Abweichung eines Simulationspunktes zu seiner theoretischen Funktion verglichen. Wenn der beobachtete Wert bei einem vorgegebenen α von 0,04 größer als der bei den Simulationen ermittelte Abstand war, wurde die empirische Verteilung als nicht an eine zufällige Verteilung angepasst angesehen.

3. Der Parameter q:

$$q = \frac{\text{Anzahl Überschreitungen}}{\text{Anzahl der Punkte}}$$

Der Parameter q ist ein grobes Maß um die Überschreitungen der empirischen, kumulativen Dichtefunktion über die Grenzen der theoretischen, zufälligen Verteilung zu erfassen.

III.5.2. DIE QUADRATMETHODE

Die Zelloberfläche der Monozyten wurde in Quadrate unterschiedlicher Größe (6,25, 4,00 und 2,56 μm^2) eingeteilt. Dies war nur bei gespreiteten Monozyten sinnvoll, da die auswertbare Zelloberfläche eine entsprechende Größe aufwies, um eine genügende Anzahl an Quadraten zu liefern. Für jeden Monozyten wurden Häufigkeitsverteilungen der pro Rasterquadrat auftretenden Silberkorndichten erstellt.
Die Prüfung, ob die empirische Verteilung auf eine Poisson-Verteilung zurückgeführt werden konnte, wurde anhand von drei Parametern vorgenommen.
Der Quotient aus Varianz und Mittelwert ($s^2/\bar{x}$) gilt als grobes Maß für die Zufälligkeit einer Verteilung. Sofern er im Bereich von 0,9 bis 1,1 lag, wurde die gegebene Verteilung als zufällig angesehen (SACHS 1978).
Der Dispersionsindex I gilt ebenfalls als ein Kriterium für die Homogenität einer empirischen Verteilung (RAO und CHAKRAVARTI 1956).

$$I = \frac{1}{\bar{x}} * \sum_{i=1}^{k} f(x_i - \bar{x})^2$$

Als weiterer Parameter zur Prüfung der Anpassung einer empirischen Verteilung an eine Poisson-Verteilung wurde der $\hat{X}^2$-Wert eingesetzt (SACHS 1978).

$$\hat{X}^2 = \sum_{i=1}^{k} \frac{(B_i - E_i)^2}{B_i}$$

Sowohl beim X^2-Anpassungstest als auch bei der Bestimmung des Dispersionsindexes I wurde die Entscheidung, ob die empirische Verteilung einer zufälligen Verteilung entstammte, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angegeben.

IV. E R G E B N I S S E

IV.1. DER TRACER

Insulin enthält vier Tyrosinreste in den Positionen A14, A19, B16 und B26, die je nach den gewählten Jodierungsbedingungen zu unterschiedlichen Anteilen jodiert werden (siehe: Abb. IV. 1.)

Zur Trennung der Isomeren wurden erst während der letzten Jahre geeignete Trennmethoden entwickelt. Der Einsatz der gereinigten Isomeren im Bindungsversuch zeigte, daß MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin das Isomer ist, das von den jodierten Tyrosinisomeren dem nativen Insulin bezüglich seiner Bindungs- und biologischen Eigenschaften am nächsten kommt (GLIEMANN et al. 1979).

In dieser Arbeit wurde dem damaligen Stand der Technik entsprechend zunächst das jodierte Isomerengemisch, das als RANDOM-markiertes Insulin bezeichnet wurde, verwendet. Seit 1983 war auch MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin verfügbar und wurde seitdem bevorzugt für die Untersuchungen eingesetzt.

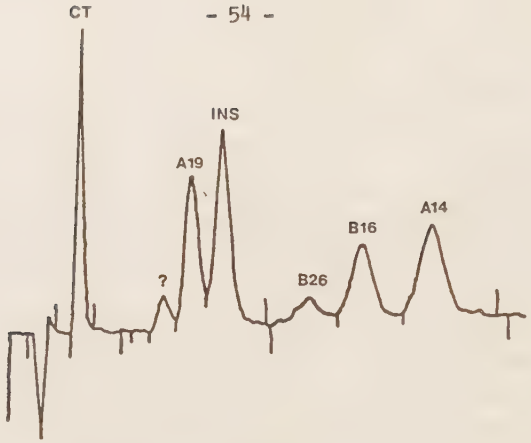


ABB.IV.1.

HPLC-AUFTRENNUNG VON JODIERTEM INSULIN

Substanz	CT	?	A19	INS	B26	B16	A14
Retentionsz. TR	3,34	7,94	9,43	11,03	15,72	18,56	22,26
Verteilung (%)		4,3	19,4	29,0	6,3	19,9	24,0

CT = Chloramin-T, INS = Insulin, A14, A19, B16, B26 = jodierte Insulin-Isomere

Folgender Jodierungsansatz wurde verwendet:

50 µl 0,2 m Phosphatpuffer, pH 7,2

50 µl entzinktes Insulin (NORDISK) (5mg/ml) in 0,2 m Phosphatpuffer, (= $4,25*10^{-8}$ mol/l)

5 µl KJ (1,4 mg/ml in dest. Wasser) (= $4,25*10^{-8}$ mol/l)

5 µl Chloramin-T (2,39 mg/ml in dest. Wasser)

Das Gemisch wurde 25 min bei Raumtemperatur inkubiert, im Anschluß daran erfolgte die HPLC-Auftrennung.

Die HPLC-Bedingungen:

Säule: 4 x 75 mm, Säulenmaterial: RP 18, 5 µm, Durchfluß: 0,75 ml/min, Puffer: 27% Acetonitril, 73% 0,2 m Ammoniumacetat, pH 5,3, Auftrag: 20 µg Insulin

Das HPLC-Chromatogramm wurde freundlicherweise von Herrn Dr. H.-J. Bubenzer zur Verfügung gestellt.

IV.2. UNTERSUCHUNGEN ZUR INSULINBINDUNG: OPTIMIERUNG DER MARKIERUNGSBEDINGUNGEN UND INTERPRETATIONSHILFEN FÜR DIE AUTORADIOGRAPHIE

Es werden die optimalen Inkubationsbedingungen für die Markierung der Zellen mit 125I-Insulin ermittelt:

- Ein Gleichgewicht der Bindung wird bei einer Inkubationstemperatur von 15°C nach 120 min, bei 25 und 37°C nach 60 min erreicht.
- Bei pH 7,8 wird das Bindungsoptimum noch nicht ganz erreicht, aber die charakteristische Spreitungsfähigkeit des Monozyten noch nicht eingeschränkt.
- Bis zu 60 * 10^6 mononukleäre Leukozyten können in den Inkubationsansatz (1,5 ml) vorgegeben werden, ohne die Linearität der Bindung zu stören.
- Mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin werden höhere Affinitätskonstanten K_a und etwas geringere Rezeptorkonzentrationen R_o pro Monozyt bestimmt als mit RANDOM-markiertem Insulin.
- Das Ausmaß unspezifischer Effekte ist beim MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin verglichen mit RANDOM-markiertem Insulin deutlich kleiner.
- Der zellbedingte Insulinabbau ist gering.

Insulinbindungsstudien an Mischpopulationen mononukleärer Leukozyten wurden von vielen Arbeitsgruppen vorgestellt (BAR 1976, DE MEYTS 1976, BECK-NIELSEN et al. 1976 und 1977, BECK-NIELSEN und PEDERSEN 1979, DE PRONZO et al. 1978). Dabei wurden die Bindungsparameter hauptsächlich aus Verdrängungsexperimenten bestimmt; außerdem kamen qualitativ unterschiedliche Tracer zum Einsatz.

Im Hinblick auf die Interpretierbarkeit der morphologischen Experimente wurden im Rahmen der vorgestellten Arbeit den Verdrängungsexperimenten Bindungsexperimente gegenübergestellt; diese erlauben für jeden Meßpunkt eine Abschätzung des Anteils der Totalbindung im Verhältnis zur unspezifischen Bindung.

Vor ihrem Einsatz bei morphologischen Experimenten wurden die Bindungseigenschaften der qualitativ unterschiedliche Tracer, RANDOM-markiertes und MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin in Abhängigkeit von Inkubationszeit,Inkubationstemperatur und pH-Wert überprüft.

Seit mit der Veröffentlichung von SCHWARTZ und Mitarbeitern (1975) der Monozyt als die eigentlich insulinbindende Zelle der Mischpopulation identifiziert wurde, sind die Meßergebnisse von fast allen Arbeitsgruppen unter Vernachlässigung der Lymphozyten auf die Monozyten normiert worden. Nur eine Arbeitsgruppe (BECK-NIELSEN et al. 1977) hat eine quantitative Trennung der Monozyten von den Lymphozyten versucht und den Bindungsanteil der Lymphozyten geschätzt.
Dem allgemein üblichen Modus folgend sind auch in dieser Arbeit die Bindungsdaten ohne Berücksichtigung der Lymphozyten auf Monozyten normiert worden. Erst bei der Darstellung der autoradiographischen Experimente wird auf die tatsächliche Bindungsbeteiligung der Lymphozyten eingegangen.

IV.2.1. ZEIT- UND TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER INSULINBINDUNG

Die Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung sollte dann studiert werden, wenn äquivalente Mengen Insulin an den Rezeptor assoziieren, bzw. von ihm dissoziieren. Der Zeitpunkt der Gleichgewichtseinstellung wurde daher für alle verwendeten Temperaturen bestimmt. Ein "steady-state" wurde bei einer Temperatur von 15°C nach 120 Minuten, bei 25 und 37°C nach 60 Minuten Inkubationsdauer erreicht. Die Abbildung IV.2. stellt an drei Beispielen den zeitlichen Verlauf der Totalbindung, der unspezifischen Bindung und der daraus errechneten spezifischen Bindung dar.

Ein Vergleich der Bindungsergebnisse zwischen den Inkubationstemperaturen zeigte, daß die spezifische Insulinbindung bei 25 und 37°C mit RANDOM-markierten Insulin im Mittel nur etwa 40 bzw. 30% der Insulinbindung von 15°C erreichte (vergl. Abb. IV.2.), während der temperaturbedingte Unterschied in der Bindungskapazität bei der Verwendung von MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin deutlich geringer ist.
Der Anteil der unspezifischen Bindung bezogen auf den eingesetzten Tracer änderte sich bei Inkubationstemperaturen von 15 und 25°C über die gesamte Inkubationszeit kaum, dagegen stieg der Anteil der unspezifischen Bindung bei beiden Tracern bei einer Inkubationstemperatur von 37°C stark an (vergl. Abb. IV.2c).

ABB.IV.2.
BEISPIELE FÜR DIE ZEITABHÄNGIGKEIT DER INSULINBINDUNG

Die Abbildungen IV.2a, b und c geben den zeitlichen Verlauf der Totalbindung (●), der unspezifischen Bindung (△) und der spezifischen Bindung (▲) bei drei Inkubationstemperaturen wieder. In Beispiel IV.2a und b wurde die gleiche Zellpräparation verwendet, Beispiel IV.2c entstammt einem anderen Bindungsexperiment.

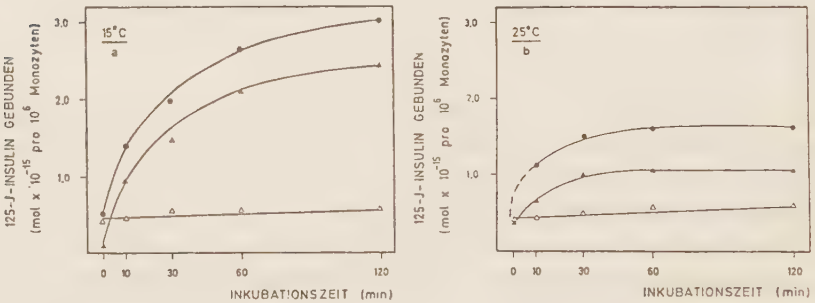


Abb.IV.2a. und b:
16,7*10^6 mononukleäre Leukozyten (17% Monozyten) wurden bei 15°C (a) und 25°C (b) mit RANDOM-markiertem 125I-Insulin einer spezifischen Aktivität von 170 µCi/µg und einer Konzentration von 5*10^{-10} mol/l inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in Parallelansätzen, denen 10^{-6} mol natives Insulin/l zugefügt war, bestimmt.

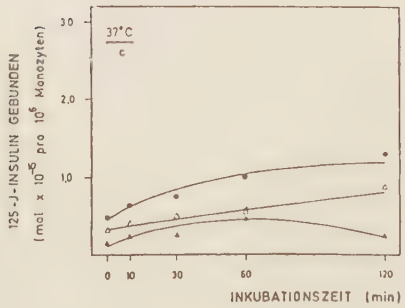


Abb.IV.1c.:
15,5*10^6 mononukleäre Leukozyten (15% Monozyten) wurden bei 37°C mit RANDOM-markiertem 125I-Insulin einer spezifischen Aktivität von 230 µCi/µg und einer Konzentration von 5*10^{-10} mol/l inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in Parallelansätzen, denen 10^{-6} mol natives Insulin/l zugefügt war, bestimmt.

IV.2.2. pH-ABHÄNGIGKEIT DER INSULINBINDUNG

Die Bindungskapazität der beiden verwendeten Tracer war bei einer Inkubationstemperatur von 15°C deutlich vom pH-Wert abhängig.
RANDOM-markiertes Insulin zeigte bei pH 8,0 ein Optimum der spezifischen Insulinbindung (siehe Abb IV.3a). Im angrenzenden pH-Bereich (7,8-8,2) wurden etwa 98-99% der maximalen Insulinbindung erreicht. Gegen den neutralen Bereich sank die spezifische Insulinbindung deutlich, bei pH 7,0 lagen nur noch etwa 30% der maximalen Bindung vor. Im stärker basischen Bereich nahm die spezifische Insulinbindung ebenfalls ab und betrug bei pH 9,0 nur noch 70% des Maximums.
Bei der Verwendung des MONO-125I-(TYR-A14)-Isulins zeigte die spezifische Insulinbindung eine veränderte pH-Abhängigkeit (siehe Abb. IV.3b.).
Im pH-Bereich von 8,0 bis 8,4 bildete die spezifische Insulinbindung ein Plateau. Die Abnahme im stärker basischen Bereich war weniger ausgeprägt als beim RANDOM-markierten Tracer, bei pH 9,0 lagen immer noch 88% der maximalen Bindung vor.
Ferner wies die spezifische Insulinbindung zwischen pH 7,6 und 7,8 eine Schulter auf, in diesem Bereich wurden nur 75% der maximalen Bindung erreicht. Im neutralen Bereich war die Insulin-Bindungskapazität ähnlich wie beim RANDOM-markierten Insulin deutlich vermindert.
Das Ausmaß der unspezifischen Bindung war im pH-Bereich von pH 7,0 bis 8,2 bei beiden Tracern unabhängig vom pH-Wert. Erst ab pH 8,4 stieg die absolute Höhe der unspezifischen Bindung.

Durch Veränderungen des pH-Werts in umgebenden Medium wurde die charakteristische Spreitungsfähigkeit der Monozyten beeinflußt.
Im pH-Bereich von 7,8 bildete der überwiegende Teil der Monozyten (90%) innerhalb von 5 min die typische Spreitungsform (Abb.IV.4b.)., die sich durch einen breiten, flachen Plasma-

ABB.IV.3.

DIE SPEZIFISCHE INSULINBINDUNG MIT RANDOM-MARKIERTEM UND MONO-125I-(TYR-A14)-INSULIN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT

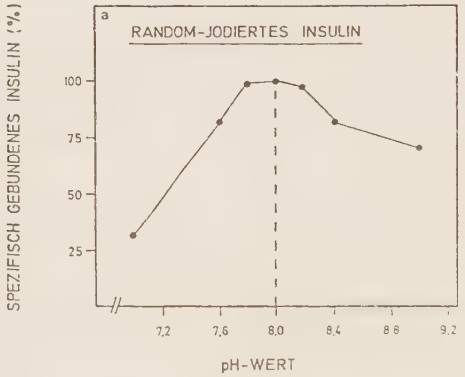


Abb.IV.3a.: RANDOM-markiertes Insulin:
$28,1*10^{6}$ mononukleäre Leukozyten (21% Monozyten) wurden mit RANDOM-markiertem 125I-Insulin einer spezifischen Aktivität von 130 µCi/µg und einer Konzentration von $5*10^{-10}$ mol/l für 120 min bei 15°C inkubiert.

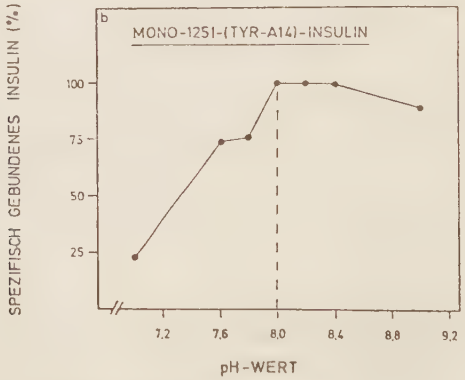


Abb.IV.3b.: MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin:
$26,8*10^{6}$ mononukleäre Leukozyten (17% Monozyten) wurden mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin einer spezifischen Aktivität von 210 µCi/µg und einer Konzentration von $5*10^{-10}$ mol/l für 120 min bei 15°C inkubiert.

saum und eine kleine Erhebung über dem Kernbereich auszeichnete. Dagegen fanden sich bereits bei pH 8,0 etwa 40% nur unvollständig gespreitete Monozyten; bei ihnen wurde der Plasmasaum kaum oder gar nicht ausgebildet. Der Anteil solcher Monozyten stieg mit der Erhöhung des pH-Wertes an. Bei pH 9,0 fanden sich nur noch etwa 10% typisch gespreitete Monozyten (Abb.IV.4c.). Auch im neutralen Medium war die Fähigkeit zur Spreitung reduziert, bei pH 7,0 erreichten nur 70% der Monozyten die typische Form (Abb.IV.4a.).

Da für den überwiegenden Teil der autoradiographischen Experimente gut gespreitete Monozyten eine wesentliche Voraussetzung bildeten, wurden - trotz der geringeren spezifischen Insulinbindung bei der Verwendung des MONO-125I-(TYR-A14)-Tracers, alle Bindungsstudien bei pH 7,8 durchgeführt.

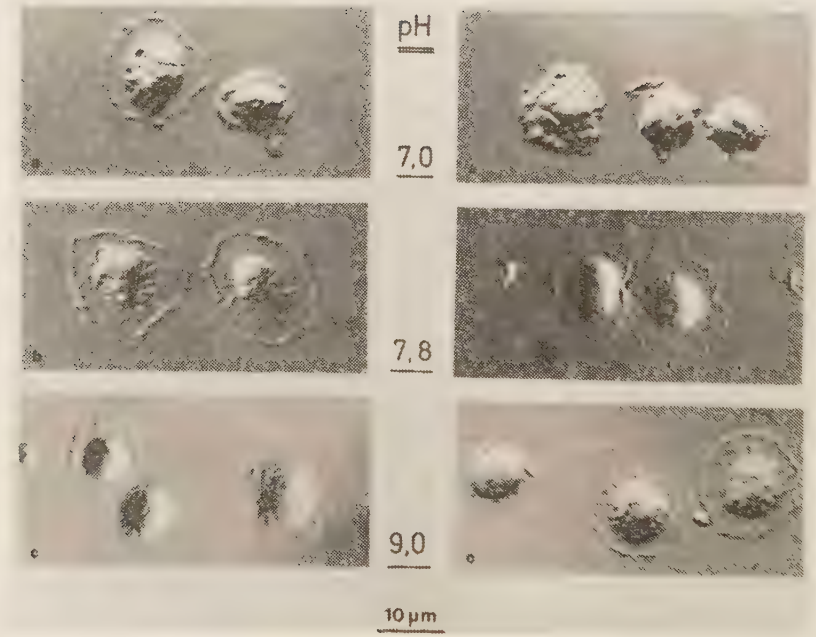


ABB.IV.4.

DIE SPREITUNGSFÄHIGKEIT DES MONOZYTEN IN ABHÄNGIKEIT VOM pH-WERT

Nur im Bereich von pH 7,8 (IV.4b.) wiesen die meisten Monozyten ihre typische Spreitungsform auf, während sowohl im basischeren Bereich von pH 9,0 (IV.4c.)als auch bei neutralem pH (IV.4a.) die Fähigkeit zur Spreitung abnahm.

IV.2.3. KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER INSULINBINDUNG: BESTIMMUNG DER AFFINITÄTSKONSTANTEN K_a UND UND DER REZEPTORKONZENTRATION R_0

Zur Bestimmung der Affinitätskonstanten K_a und der Rezeptorkonzentration R_0 wurden mononukleäre Leukozyten bei 15°C mit Insulinkonzentrationen von $5*10^{-11}$ bis 10^{-8} mol/l für zwei Stunden inkubiert. Die Inkubationstemperatur von 15°C wurde gewählt, um einen Vergleich mit den ebenfalls bei 15°C bestimmten Affinitätskonstanten, die von anderen Arbeitsgruppen für Monozyten angegeben wurden, zu ermöglichen.

Zwei experimentelle Varianten wurden gegenübergestellt.
Zum einen wurden Verdrängungsstudien durchgeführt, wobei der radioaktive Tracer, der in einer konstanten Konzentration von $5*10^{-11}$ oder 10^{-10} mol Insulin/l vorlag, durch zunehmende Konzentrationen an nicht radioaktiv markiertem Insulin (MCI) verdrängt wurde. Diese Experimente sind in Tabelle IV.1. mit V gekennzeichnet.
Zum anderen wurden Bindungsanalysen mit steigenden Konzentrationen an radioaktiv markiertem Insulin erstellt; bei diesen Experimenten wurde die unspezifische Bindung für alle Tracerkonzentrationen bestimmt. Zu jeder Insulinkonzentration lagen daher Parallelproben vor, denen neben dem radioaktiven Tracer natives Insulin in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l zugefügt wurde.
Diese Experimente werden in der Tabelle IV.1. mit B gekennzeichnet.

Die Bindungsdaten der bezüglich ihres Tracers und ihres Bindungsansatzes unterschiedlichen Experimente wurden nach dem von PETERS und PINGOUD (1979 und 1982) vorgeschlagenen Verfahren ausgewertet (siehe III.2.4., Seite 28).
Dieses Verfahren erlaubt die Anpassung der Bindungskurven an ein einklassiges oder zweiklassiges Bindungsmodell. Alle Bin-

TABELLE IV.1.

DIE BESTIMMUNG DER AFFINITÄTSKONSTANTEN K_a UND DER REZEPTORKONZENTRATION R_0 MIT RANDOM-MARKIERTEM UND MONO-125I-(TYR-A14)-INSULIN

Tracer-sorte	Exp. nr.	spez. Akt. (µCi/µg)	Art des Experiments	$K_a * 10^9$ (1/mol)	R_0/MZ (Moleküle)
	1	250	B	1,68	2530
RANDOM-	2	170	B	2,96	1490
markiert.	3	200	B	1,27	2590
Insulin	4	290	B	1,53	2360
	5	330	V	4,29	1200
MONO-125I-	6	330	V	2,89	2010
(TYR-A14-					
Insulin	7	310	B	3,89	1610
	8	310	B	2,89	1740

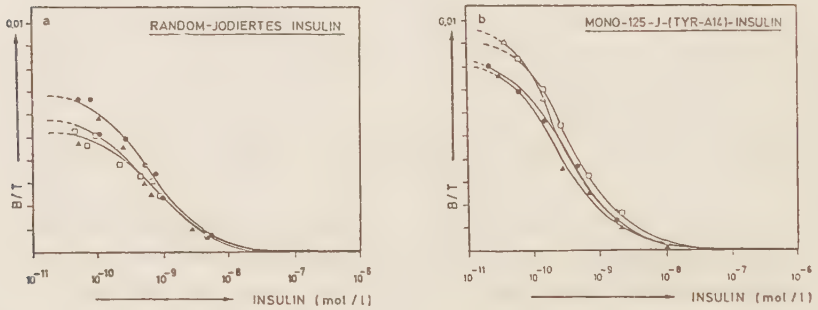
Bei den einzelnen Experimenten wurde die Insulinbindung im Konzentrationsbereich von $5*10^{-10}$ bis 10^{-8} mol Insulin/l an 6-8 Meßpunkten bestimmt (vergl. Abb.IV.5., Seite 66). Die unspezifische Bindung wurde im Verdrängungsexperiment (V) bei der verwendeten Tracerkonzentration ($5*10^{-10}$ und 10^{-10} mol/l) und im Bindungsexperiment (B) bei allen gegebenen Konzentrationen durch Parallelproben, denen 10^{-6} mol natives Insulin/l zugefügt wurde, bestimmt.

Die Abkürzungen bedeuten: spez. Akt. = spezifische Radioaktivität des Tracers, K_a = Affinitätskonstante, R_0 = Rezeptorkonzentration, MZ = Monozyt, B = Bindungsexperiment, V = Verdrängungsexperiment.

dungsdaten wurden dahingehend überprüft, ob sie einem der beiden Modelle eindeutig zuzuordnen waren.
Unabhängig von der Tracersorte wurde das zweiklassige Bindungsmodell bei allen Experimenten mit dem verwendeten Verfahren abgelehnt, während das einklassige Bindungsmodell mit niedrigen Fehlerfaktoren (PETERS und PINGOUD 1979) akzeptiert wurde.
In der Tabelle IV.1. sind die ermittelten Werte der Affinitätskonstanten K_a und der Rezeptorkonzentration R_0 aufgelistet. RANDOM-markiertes Insulin zeigte verglichen mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin veränderte Bindungseigenschaften (vergl. Tabelle IV.1. und Abb. IV.5.).
MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin wies eine höhere Affinität zum Insulinrezeptor auf. Im Mittel lag die Affinitätskonstante mit $3{,}49*10^9$ l/mol ($s= \pm 0{,}71*10^9$) etwa 40% höher als die mittlere Affinitätskonstante des RANDOM-markierten Insulins mit $1{,}86*10^9$ l/mol ($s= \pm 0.75*10^9$).
Die Rezeptorkonzentration R_0 ,die mit RANDOM-jodiertem Insulin bestimmt wurde, lag im Mittel bei 2240 Rezeptoren pro Monozyt ($s= \pm 500$). Mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin wurde ein niedrigerer Rezeptorbesatz von 1640 Rezeptoren pro Monozyt ($s= \pm 340$) ermittelt. Die Streubreite der mit einem Tracer bestimmten Rezeptorkonzentrationen R_0 war allerdings so groß, daß keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Liganden vorlagen.
Der Vergleich der beiden experimentellen Varianten - des Bindungs- (Tabelle IV.1., Exp. 7 und 8) und des Verdrängungsansatzes (Tabelle IV.1., Exp. 5 und 6) - ergab beim MONO-125I-(TYRA14)-Insulin keinen Unterschied bezüglich der Bindungsparameter.

ABB.IV.5.
DIE KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER SPEZIFISCHEN INSULINBINDUNG

Die Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen Insulinbindung wurde für drei Experimente (●,▲,□), die mit RANDOM-jodiertem Insulin durchgeführt wurden und für vier Experimente (□,△,●,▲), die mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin durchgeführt wurden, dargestellt. Alle Experimente wurden für 2h bei 15°C inkubiert. Die eingezeichneten Punkte (●,▲,△ oder □) repräsentieren die gemessenen spezifischen Bindungswerte (B/T) bei der jeweiligen Tracerkonzentration (T), während die Kurven die zu den jeweiligen Daten mit dem nicht linearen Regressionsverfahren nach PETERS und PINGOUD (1979 und 1982) berechnete Bindungsisotherme wiedergeben.



a.: RANDOM-markiertes Insulin:

Bindungsbedingungen(a):

Exp.	mLkz. /Ans. *10^6	MZ (%)	spez.Akt. (µCi/µg)
●	18,6	14	200
▲	18,4	14	250
□	9,9	40	290

b.: MONO-125-JOD-(TYR-A14)-Insulin:

Bindungsbedingungen(b):

Exp.	mLkz. /Ans. *10^6	MZ (%)	spez.Akt. (µCi/µg)
□	33,3	15	330
△	20,0	14	310
●	20,8	17	310
▲	28,0	14	330

mLkz. = mononukleäre Leukozyten, MZ = Monozyten.

Biochemische Bindungsexperimente und die Markierungen für autoradiographische Untersuchungen unterschieden sich in methodischer Hinsicht durch die gewählte Technik, mit der das freie vom gebundenen Insulin abgetrennt wurde.
Den hydrophoben Eigenschaften des Silikonöls entsprechend ist der zellkonzentrationsabhängige Anteil an mitgerissenem Medium relativ hoch (8-12 µl/ 10-20*10^6 mononukleärer Leukozyten). Im Percoll^{TM}-Gradienten schwankt der mitgerissene Anteil je nach Handhabung, kann aber ausgewaschen werden. Parallele Experimente ergeben für die berechnete spezifische Bindung entweder keinen Unterschied oder leicht niedrigere Werte bei Verwendung des Percoll^{TM}-Gradienten.
In der Abb. IV.6. sind aus den vorliegenden biochemischen Bindungsexperimenten jeweils die beiden extremen Bindungskurven in Form von Sättigungskurven dargestellt; dazu sind vergleichsweise die Einzelpunkte, die die jeweiligen spezifischen Bindungswerte der autoradiographischen Markierungsexperimente wiedergeben, eingetragen worden.
Der Unterschied in den Bindungseigenschaften zwischen RANDOM-markiertem und MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin wird auch in dieser Darstellung deutlich.
Aus der Abbildung IV.6. läßt sich aber auch die Streubreite der einzelnen Experimente, die zu einem wesentlichen Teil von der Variation des biologischen Materials abhängt, ablesen.
Anhand dieser Abbildung kann der Besetzungsgrad der Insulinrezeptoren bei den gewählten Bedingungen abgeschätzt werden. Während bei 10^{-9} mol/l etwas mehr als die Hälfte der Rezeptoren mit Insulin besetzt war, näherte sich die Insulinbindung erst im Bereich von 10^{-8} mol/l der Sättigung.

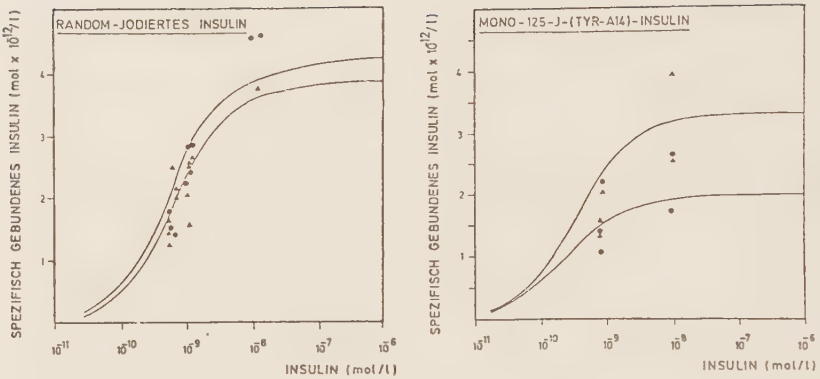


ABB.IV.6.
DIE SPEZIFISCHE INSULINBINDUNG DES RANDOM-MARKIERTEN UND DES MONO-125I-(TYR-A14)-INSULINS ERMITTELT MIT DER ÖL- UND DER GRADIENTEN-ZENTRIFUGATIONSMETHODE

Die bei einem autoradiographischen Experiment nach Percoll^{TM}-Gradientenzentrifugation einschließlich Nachreinigung ermittelten spezifischen Bindungswerte der sofort fixierten (▲) und der erst im Anschluß an die Nachreinigung fixierten Zellen (●) (Präparation siehe Kapitel III.3.1.) wurden bei den entsprechenden Insulinkonzentrationen eingetragen.
Die Kurven beschreiben die obere und untere Grenze des Bindungsbereichs, der sich aus den mit dem Verfahren von PETERS und PINGOUD (1979 und 1982) korrigierten Bindungsdaten der in Abb.IV.5. dargestellten Experimente ableiten läßt. Die Abtrennung des nicht gebundenen Insulins erfolgte bei diesen Experimenten mittels Ölzentrifugation.

IV.2.4. DER ANTEIL DER UNSPEZIFISCHEN BINDUNG

Konventionell wird unter unspezifischer Bindung der Anteil an zellassoziiert gemessener Radioaktivität verstanden, der bei einem Überschuß an nativem Insulin (10^{-6} mol/l) nicht verdrängbar ist. Diese zellassoziierte Radioaktivität kann sich aus folgenden Anteilen zusammensetzen:

1) dem Teil des Tracers, der an die Zelloberfläche adsorbiert, aber nicht an den Rezeptor gebunden, vorliegt,
2) dem Teil des Tracers, der von den Zellen internalisiert wurde, sodaß er nicht mehr verdrängbar ist und
3) dem Teil des Tracers, der während der Abtrennung von freiem und gebundenem Liganden von den Zellen mitgerissen wurde.

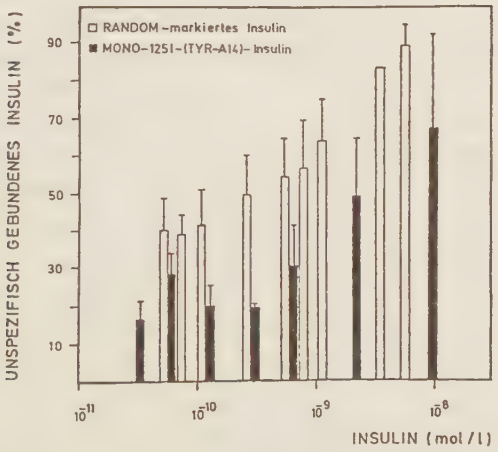


ABB.IV.7.
DIE HÖHE DER UNSPEZIFISCHEN BINDUNG BESTIMMT MITTELS ÖLZENTRIFUGATION

Die mittleren Werte der unspezifischen Bindung, die auf die Totalbindung bezogen sind, wurden bei den entsprechenden Insulinkonzentrationen aus vier Experimenten bei der Verwendung des RANDOM-markierten Insulins (□) und aus acht Experimenten bei der Verwendung des MONO-125I-(TYR-A14)-Insulins (■) bestimmt.

Der mitgerissene Anteil an 125I-Insulin kann je nach Trenntechnik variieren und läßt sich, wie bereits erwähnt, bei der Verwendung des Percoll^{TM}-Gradienten im Gegensatz zur Ölzentrifugation auswaschen (vergl. Abschnitt III.2.3, Seite 25). Bei der Analyse der Bindungsparameter kann die unspezifische Bindung zur Ermittlung der spezifischen Insulinbindung rechnerisch von der Totalbindung subtrahiert werden.
Bei topographischen Studien ist keine Unterscheidung zwischen spezifisch und unspezifisch markierten Bindungsanteilen möglich. Mit zunehmendem Anteil an unspezifischer Bindung wird daher die Lokalisation der Rezeptororte verunschärft.
Die Abbildung IV.7. stellt den prozentualen Anteil der unspezifischen Bindung am Gesamtsignal für die mit der Ölzentrifugation ermittelten Bindungswerte bei 15°C dar. Da die unspezifische Bindung bei den verwendeten Insulinkonzentrationen nicht sättigbar war, umfaßte sie mit steigender Insulinkonzentration immer größere Anteile der Totalbindung. Bei niedrigen, physiologischen Insulinkonzentrationen machte die unspezifische Bindung bei der Verwendung des MONO-125I-(TYR-A14)-Tracers immerhin bereits 20% der Totalbindung aus, nahm bei höheren Konzentrationen sukzessiv zu und erreichte bei 10^{-8} mol Insulin/l 60- 70% der Totalbindung. Bei der Verwendung von RANDOM-markiertem Insulin war der Anteil der unspezifischen Bindung im physiologischen Bereich verglichen mit MONO-125I-(TYR-A14)-Tracer fast doppelt so hoch. Im unphysiologischen Konzentrationsbereich ließ sich fast 90% des gesamten Signals auf unspezifisch adsorbiertes Insulin zurückzuführen.
Bei der Verwendung der Percoll^{TM}-Gradientenzentrifugation läßt sich das mitgerissene 125I-Insulin im Anschluß an die Abtrennung des freien Insulins durch mehrfaches Sedimentieren der Zellsuspension auswaschen. So verminderte sich der Anteil der unspezifischen Bindung drastisch (siehe: Tabelle IV.2.).
Für beide Tracer lag die unspezifische Bindung im physiologischen Konzentrationsbereich bei Inkubationstemperaturen von 15 und 25°C unter 10%. Im unphysiologisch hohen Konzetrations-

bereich umfaßte beim RANDOM-markierten Insulin die unspezifische Bindung allerdings bereits etwa 30% der Totalbindung, während sie beim MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin nur auf knapp 17% zunahm. Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C stieg die unspezifische Bindung generell an. Sie umfaßte beim MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin im Konzentrationsbereich von 10^{-9} mol/l etwa 20% des Gesamtsignals und bei 10^{-8} mol Insulin/l nahm die unspezifische Bindung nochmals deutlich zu, sodaß sie bis zu 2/3 der Totalbindung erreichte.
Eine Differenzierung zwischen dem Anteil der unspezifischen Bindung, der sich auf die Fraktion der Monozyten, und dem Anteil der auf die Lymphozyten zurückführen ließ, war bei der Radioaktivitätsmessung nicht möglich. Erst die Autoradiographie erlaubte eine Unterscheidung der mononukleären Leukozyten auch bezüglich dieses Parameters.

TABELLE IV.2.
DIE HÖHE DER UNSPEZIFISCHEN BINDUNG BESTIMMT IM ANSCHLUß AN DIE PERCOLL™-GRADIENTENZENTRIFUGATION EINSCHLIEßLICH NACHREINIGUNG

Inkub. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	proz. Anteil der unspez. Bindung bez. auf die Totalbd. RANDOM-markiertes n	Insulin	MONO-125I-(TYR-A14)- n	Insulin
15	$5*10^{-10}$	3	4,3 ± 2,0		nicht bestimmt
15	10^{-9}	4	5,6 ± 2,0	3	4,8 ± 1,8
15	10^{-8}	2	30,1 ± 7,9	2	16,7 ± 4,5
25	10^{-9}	2	9,3 ± 1,1	3	6,9 ± 2,5
25	10^{-8}		nicht bestimmt	2	24,9 ± 5,4
37	10^{-9}		" "	4	17,4 ± 2,8
37	10^{-8}		" "	2	69,7 ± 8,3

n = Anzahl der Experimente

IV.2.5. DIE DISSOZIATION DES GEBUNDENEN INSULINS BEI RAUMTEMPERATUR

Die Dissoziationskinetik des 125I-Insulins für die verwendete Zellpopulation wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit (GIESEN 1981) beschrieben. Bei Raumtemperatur nahm die mittlere spezifische Bindung innerhalb der ersten 5 min um 20% ab, nach 15 min waren bereits 50% des gebundenen Insulins dissoziiert und nach 120 min lagen nur noch 20-25% der gemessenen Radioaktivität zellassoziiert vor (vergl. Abb.IV.8.: Die eingezeichnete Kurve repräsentiert eine solche Dissoziationskinetik).
Zur Herstellung von Zellausstrichpräparaten gespreiteter Monozyten war es notwendig, die Zellsuspension für die Zeitspanne von 5 min auf einem Glasobjektträger bei Raumtemperatur zu inkubieren (siehe Kapitel III.3.1., Seite 34). Nicht nur bei der Bestimmung der Insulinbindung mußte der Verlust an zellgebundener Radioaktivität berücksichtigt werden, sondern auch zur Berechnung der autoradiographischen Dosis war es notwendig, die aktuellen Bindungswerte der Totalbindung und der unspezifischen Bindung zu kennen. Daher wurden vor der Herstellung der Zellausstrichpräparate von der nicht fixierten Zellsuspension Aliquots entnommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Vergleich zu einer direkt nach der Nachreinigung fixierten Parallelprobe ließ sich die Dissoziationsrate bei jedem Experiment individuell bestimmen.
In der Abbildung IV.8. sind die Dissoziationsraten für die Totalbindung dargestellt. Während die Dissoziationsraten nach einer zweistündigen Inkubation bei 15°C bei etwa 20% liegen, und sich so mit der aus den Dissoziationsexperimenten ermittelten Rate decken, streuen die nach einer Inkubation bei 25 und 37°C bestimmten Werte stärker.
Die Dissoziationsraten, die bei der unspezifischen Bindung ermittelt wurden, streuen wegen des kleinen Meßsignal ebenfalls stark, liegen aber in der gleichen Größenordnung wie die Werte, die für den Totalbindungsansatz bestimmt wurden.

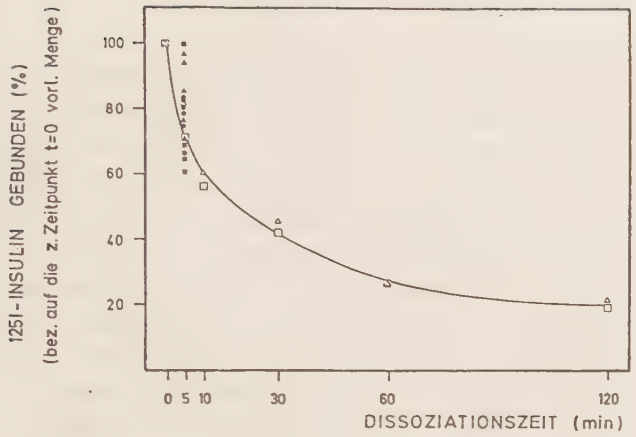


ABB.IV.8.
DIE DISSOZIATION DES 125I-INSULINS BEI RAUMTEMPERATUR

Die Kurve ist aus zwei Experimenten gemittelt und stellt die Dissoziationskinetik des 125I-Insulins dar.
Mononukleäre Leukozyten (Exp.1 (□): $22{,}4*10^6$ m.Lkz., 12% Monozyten; Exp.2 (△): $40{,}3*10^6$ m.Lkz., 15% Monozyten) wurden für 2h bei 15°C mit 125I-Insulin einer spezifischen Aktivität von 250 µCi/µg (□), bzw. 180 µCi/µg (△) und einer Konzentration von $5*10^{-10}$ mol/l (□) bzw. $1*10^{-9}$ mol/l (△) inkubiert. Nach Abtrennung des nicht gebundenen Insulins im Percoll^{TM}-Zweistufengradienten und anschließendem dreimaligen Waschen der Zellsuspension bei 4°C wurde die Zellsuspension für 120 min in Hanks-Puffer (pH=7,4, 280 mosmol/kg) bei 23°C inkubiert. Zum Zeitpunkt t=0, 5, 10, 30, 60 und 120 min wurden Aliquots entnommen. Der dissoziierte Anteil an Insulin wurde von den Zellen durch Ölzentrifugation abgetrennt. Die im Zellpellet verbleibende Radioaktivität wurde auf die entsprechende Zellzahl normiert und mit der zellgebundenen Menge an 125I-Insulin zum Zeitpunkt t=0 min verglichen.
Die zum Zeitpunkt t= 5 min eingetragenen Werte (●, ▲, ■) repräsentieren den dissoziierten Anteil an 125I-Insulin, der, um die Dissoziation des Tracers bei der Herstellung der Zellausstrichpräparate gespreiteter Monozyten abschätzen zu können, bei den autoradiographischen Experimenten bestimmt wurde. Der innerhalb von 5 min dissoziierte Anteil an 125I-Insulin wird nach Inkubationen bei 15°C (●), 25°C (▲) und 37°C (■) dargestellt.

IV.2.6. DER ANTEIL VON 125I-INSULINBRUCHSTÜCKEN

Niedermolekulare 125I-markierte Bruchstücke des eingesetzten Insulins können die Insulinbindung beeinflussen und zu Fehlern bei der Interpretation der Bindungsdaten führen, indem sie die aktuelle Insulinkonzentration verändern oder unspezifisch an die Zellen adsorbieren. Daher wurde der Anteil an Abbauprodukten des 125I-Insulins mittels Trichloressigsäure(TCA)-Präzipitation bestimmt. Diese Methode gilt allerdings nur als ein grober Anhaltspunkt für das Ausmaß an Abbauprodukten, da zwar niedermolekulare Fragmente wie 125I und 125I-Tyrosin in Trichloressigsäure löslich sind, es aber nicht bekannt ist, bis zu welcher Größe 125I-Oligopeptide nicht gefällt werden können.

a) Anteil von 125I-Bruchstücken in der Tracerpräparation:
RANDOM-markiertes Insulin unterschied sich vom MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin hinsichtlich des TCA-löslichen Anteils deutlich. MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin wies eine niedrige Rate an Abbauprodukten (<1%) auf, die auch im Laufe einer Lagerung von mehr als 60 Tagen bei -18°C nur geringfügig auf etwa 2% anstieg. RANDOM-markiertes Insulin zeigte bereits unmittelbar nach der Jodierung eine Rate von etwa 6% nicht fällbarer Abbauprodukte, die schon im Verlauf einer kurzen Lagerung von einer Woche auf 10% zunahm.

b) Zellbedingter Insulinabbau:
Um den Einfluß der mononukleären Leukozyten auf den 125I-Insulinabbau während der Inkubation zu prüfen, wurde der Anteil an nicht fällbarer Radioaktivität zu Beginn und Ende der Inkubation getestet.
Der Insulinabbau durch die mononukleären Leukozyten war sowohl beim RANDOM-markierten Insulin, als auch beim MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin bei Inkubationstemperaturen von 15 und 25°C gering (vergl. Tabelle IV.3.). Erst bei 37°C war ein drei- bis vierfacher Anstieg der niedermolekularen Bruchstücke

zu erkennen.
Bei beiden Tracern stieg der Insulinabbau verglichen mit einem Zeitpunkt vor der Inkubation weniger an, wenn dem Medium natives Insulin in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l zugefügt wurde.
Ein Einfluß des pH-Werts auf die Abbaurate konnte im Bereich von pH 7,0 bis 9,0 für beide Tracer nicht festgestellt werden.

TABELLE IV.3.

DER IM VERLAUF DER INKUBATION GEBILDETE ANTEIL AN NICHT TCA-FÄLLBAREN 125I-INSULINBRUCHSTÜCKEN

		Anteil an nicht TCA-fällbarer Radioaktivität im Medium bezogen auf 10^7 mononukleäre Leukozyten					
Inkub. bed.	Insulinkonz. (mol/l)	RANDOM-markiertes Insulin			MONO-125I-(TYR-A14)-INSULIN		
		n	TB (%)	NSB (%)	n	TB (%)	NSB (%)
15°C/2h	$\leq 10^{-9}$	9	0,87 ± 0,67	0,36 ± 0,21	3	0,24 ± 0,23	0,02 ± 0,02
15°C/2h	10^{-8}	1	0,36	0,36	0	-	
25°C/1h	$\leq 10^{-9}$	6	0,81 ± 0,51	0,41 ± 0,39	3	0,83 ± 0,43	0,21 ± 0,13
25°C/1h	10^{-8}	0	-	-	2	0,20 ± 0,26	0,15 ± 0,21
37°C/1h	$\leq 10^{-9}$	2	2,22 ± 0,86	0,91 ± 0,28	4	2,91 ± 1,70	0,94 ± 0,48
37°C/1h	10^{-8}	0	-	-	2	1,19 ± 0,54	1,01 ± 0,30

n = Anzahl der Experimente, TB = Totalbindung, NSB = unspezifische Bindung.

Zur Ermittlung der Rate an 125I-Insulinbruchstücken wurde die nach der Inkubation bestimmte Menge an nicht-fällbarer Radioaktivität auf die im Inkubationsansatz vorliegende Menge an Tracer bezogen.
Der nach Ablauf der Inkubation bestimmte Abbau wurde um den Anteil an TCA-löslichen 125I-Insulinbruchstücken korrigiert, der in der verwendeten 125I-Insulincharge bereits vor dem Einsatz in ein Bindungsexperiment vorlag.
Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde die verbleibende Menge an 125I-Insulinbruchstücken auf 10^7 mononukleäre Leukozyten normiert.

IV.3. EINFLUß DER MORPHOLOGIE DER MONONUKLEÄREN LEUKOZYTEN AUF DIE AUTORADIOGRAPHISCHE AUSWERTUNG VON ZELLAUSSTRICHPRÄPARATEN

Die Konsequenzen, die sich aus der Morphologie der mononukleären Leukozyten für die autoradiographische Auswertung von Zellausstrichpräparaten ergeben, werden dargestellt.

- In den Autoradiogrammen liegen je nach Präparationsbedingungen Zellformen mit unterschiedlichen Oberflächenstrukturen vor: 1) kugelförmige Lymphozyten, und 2) kugelförmige Monozyten oder 3) gespreitete Monozyten.
- Bei den "flachen" gespreiteten Monozyten ist die Zelloberfläche glatt, die Plasmamembranfläche kann aus der Projektionsfläche der lichtmikroskopischen Abbildung bestimmt werden, Projektionseffekte spielen bei der Beurteilung der Verteilungsmuster der autoradiographischen Silberkörner keine Rolle.
- Kugelförmige Zellen (Monozyten und Lymphozyten) weisen ein Oberflächenrelief aus Falten und Furchen auf, sodaß eine Bestimmung der Plasmamembranfläche nicht möglich ist.
- Die Detektorschicht ist bei gespreiteten Monozyten mit der gesamten Plasmamembranfläche der oberen Zellhälfte in engem Kontakt, bei kugelförmigen Zellen jedoch nur mit einem Teil der Plasmamembranfläche.
- Entsprechend der Strahlungscharakteristik der 125I-Elektronen ist die Zählausbeute bei kugelförmigen Monozyten verglichen mit den gespreiteten Monozyten aufgrund der Oberflächenstruktur um die Hälfte vermindert; bei Lymphozyten wird ein geringerer Einfluß auf die Zählausbeute vermutet.
- Daraus ergibt sich, daß bei gespreiteten Monozyten eine quantitative Bestimmung und Lokalisation der Insulin-Rezeptor-Komplexe möglich ist, während sich die Bindungskapazitäten von Lymphozyten nur näherungsweise schätzen lassen.

Die Morphologie der verwendeten mononukleären Leukozyten ist in zahlreichen lichtmikroskopischen, aber auch in raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Studien untersucht worden; eine detaillierte Übersicht gibt z.B. BESSIS (1973). In diesem Kapitel werden nur die morphologischen Charakteristika beschrieben, die in die Interpretation der Autoradiogramme eingehen. Im wesentlichen sind dies die Oberflächenstrukturen und die Geometrie der im Ausstrichpräparat vorliegenden Zellen.
80 bis 90% der verwendeten Mischpopulation bestehen aus unterschiedlich großen Lymphozyten; im Schnittpräparat werden Durchmesser von 5-10 µm beobachtet. Die transmissionselektronenmikroskopische Abbildung IV.9.a zeigt einen Bereich "kleiner" und "mittelgroßer" annähernd runder Lymphozyten, die kurze mikrovilliähnliche Ausläufer aufweisen.
Verglichen mit den Lymphozyten bilden die größeren Monozyten (ø 7-12 µm) in Suspension lange Zellausläufer aus (vergl. Abb.IV.9.b).
Wenn Lymphozyten und Monozyten in Suspension fixiert, auf Objektträgern ausgestrichen und an Luft getrocknet werden, so behalten sie ihre annähernd kugelige Form (siehe Abb.III.2.a, Seite 33 und Tabelle III.3, Seite 38). Im Rasterelektronenmikroskop sind die beiden Zelltypen nicht leicht zu unterscheiden. Es lassen sich aber unterschiedlich ausgeprägte Oberflächenreliefs in Form von Falten und Furchen erkennen (vergl. Abb. IV.10.), wobei Monozyten offenbar stärker aufgefaltete Oberflächenstrukturen aufweisen.

Wenn Monozyten auf Glasoberflächen spreiten, so glättet sich die Zelloberfläche je nach Stadium des Spreitens zunehmend (vergl. Abb.IV.11.a & b). Nach einer Spreitungsdauer von 5 min (RT) (siehe: Kapitel III.3.1.b) fanden sich neben fortgeschrittenen Spreitungsstadien (Abb.IV.11.(1)) auch Übergangsformen, die den für den gespreiteten Monozyten typischen Plasmasaum mit einem Durchmesser von mindestens 2 µm noch nicht ausgebildet hatten (Abb.IV.11.(2)). Diese Zellen wurden in

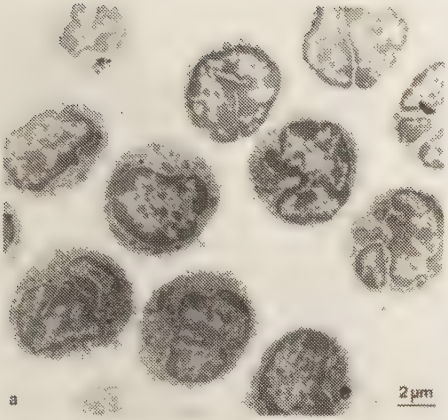
IV.3. EINFLUß DER MORPHOLOGIE DER MONONUKLEÄREN LEUKOZYTEN AUF DIE AUTORADIOGRAPHISCHE AUSWERTUNG VON ZELLAUSSTRICHPRÄPARATEN

Die Konsequenzen, die sich aus der Morphologie der mononukleären Leukozyten für die autoradiographische Auswertung von Zellausstrichpräparaten ergeben, werden dargestellt.

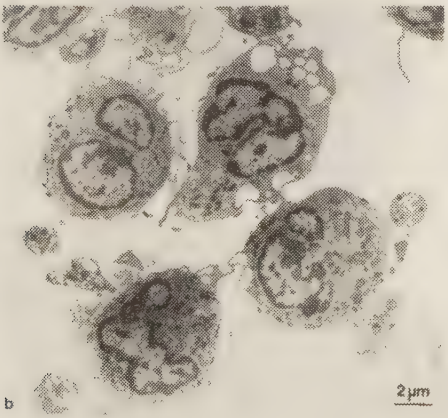
- In den Autoradiogrammen liegen je nach Präparationsbedingungen Zellformen mit unterschiedlichen Oberflächenstrukturen vor: 1) kugelförmige Lymphozyten, und 2) kugelförmige Monozyten oder 3) gespreitete Monozyten.
- Bei den "flachen" gespreiteten Monozyten ist die Zelloberfläche glatt, die Plasmamembranfläche kann aus der Projektionsfläche der lichtmikroskopischen Abbildung bestimmt werden, Projektionseffekte spielen bei der Beurteilung der Verteilungsmuster der autoradiographischen Silberkörner keine Rolle.
- Kugelförmige Zellen (Monozyten und Lymphozyten) weisen ein Oberflächenrelief aus Falten und Furchen auf, sodaß eine Bestimmung der Plasmamembranfläche nicht möglich ist.
- Die Detektorschicht ist bei gespreiteten Monozyten mit der gesamten Plasmamembranfläche der oberen Zellhälfte in engem Kontakt, bei kugelförmigen Zellen jedoch nur mit einem Teil der Plasmamembranfläche.
- Entsprechend der Strahlungscharakteristik der 125I-Elektronen ist die Zählausbeute bei kugelförmigen Monozyten verglichen mit den gespreiteten Monozyten aufgrund der Oberflächenstruktur um die Hälfte vermindert; bei Lymphozyten wird ein geringerer Einfluß auf die Zählausbeute vermutet.
- Daraus ergibt sich, daß bei gespreiteten Monozyten eine quantitative Bestimmung und Lokalisation der Insulin-Rezeptor-Komplexe möglich ist, während sich die Bindungskapazitäten von Lymphozyten nur näherungsweise schätzen lassen.

Die Morphologie der verwendeten mononukleären Leukozyten ist in zahlreichen lichtmikroskopischen, aber auch in raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Studien untersucht worden; eine detaillierte Übersicht gibt z.B. BESSIS (1973). In diesem Kapitel werden nur die morphologischen Charakteristika beschrieben, die in die Interpretation der Autoradiogramme eingehen. Im wesentlichen sind dies die Oberflächenstrukturen und die Geometrie der im Ausstrichpräparat vorliegenden Zellen.
80 bis 90% der verwendeten Mischpopulation bestehen aus unterschiedlich großen Lymphozyten; im Schnittpräparat werden Durchmesser von 5-10 µm beobachtet. Die transmissionselektronenmikroskopische Abbildung IV.9.a zeigt einen Bereich "kleiner" und "mittelgroßer" annähernd runder Lymphozyten, die kurze mikrovilliähnliche Ausläufer aufweisen.
Verglichen mit den Lymphozyten bilden die größeren Monozyten (ø 7-12 µm) in Suspension lange Zellausläufer aus (vergl. Abb.IV.9.b).
Wenn Lymphozyten und Monozyten in Suspension fixiert, auf Objektträgern ausgestrichen und an Luft getrocknet werden, so behalten sie ihre annähernd kugelige Form (siehe Abb.III.2.a, Seite 33 und Tabelle III.3, Seite 38). Im Rasterelektronenmikroskop sind die beiden Zelltypen nicht leicht zu unterscheiden. Es lassen sich aber unterschiedlich ausgeprägte Oberflächenreliefs in Form von Falten und Furchen erkennen (vergl. Abb. IV.10.), wobei Monozyten offenbar stärker aufgefaltete Oberflächenstrukturen aufweisen.

Wenn Monozyten auf Glasoberflächen spreiten, so glättet sich die Zelloberfläche je nach Stadium des Spreitens zunehmend (vergl. Abb.IV.11.a & b). Nach einer Spreitungsdauer von 5 min (RT) (siehe: Kapitel III.3.1.b) fanden sich neben fortgeschrittenen Spreitungsstadien (Abb.IV.11.(1)) auch Übergangsformen, die den für den gespreiteten Monozyten typischen Plasmasaum mit einem Durchmesser von mindestens 2 µm noch nicht ausgebildet hatten (Abb.IV.11.(2)). Diese Zellen wurden in



a) LYMPHOZYTEN



b) MONOZYTEN

ABB.IV.9.a & b

a) AREAL KLEINER UND MITTELGROßER LYMPHOZYTEN

b) AREAL MEHRERER UNREGELMÄßIG GESTALTETER MONOZYTEN

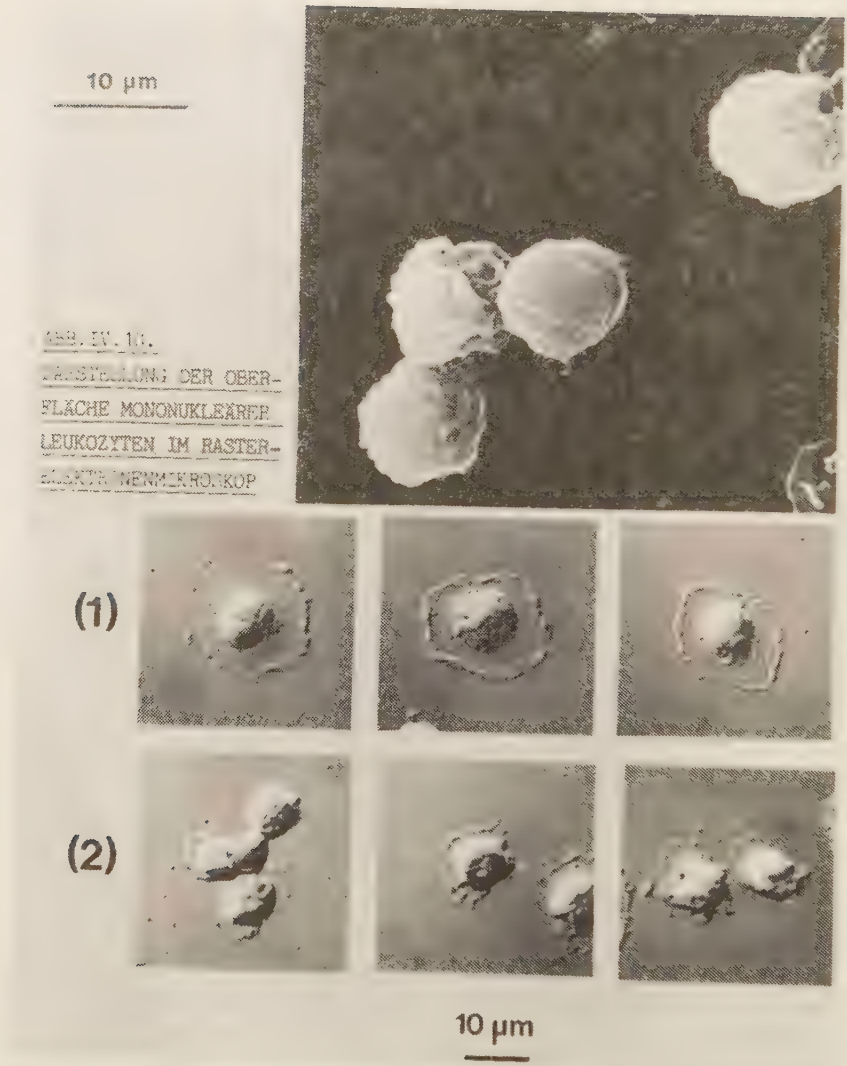


ABB. IV. 11.
DARSTELLUNG DER OBERFLÄCHE MONONUKLEÄRER LEUKOZYTEN IM RASTERELEKTRONENMIKROSKOP

ABB.IV.11.

DARSTELLUNG GESPREITETER MONOZYTEN IM INTERFERENZKONTRAST (LICHTMIKROSKOP)

Neben fortgeschrittenen Spreitungsstadien (1), die sich durch einen deutlichen Plasmasaum und einen meist in der Zellmitte liegenden Kernbereich auszeichnen, finden sich Übergangsformen mit kaum oder wenig ausgeprägtem Plasmasaum (2).

die autoradiographische Auswertung nicht einbezogen.

Die fortgeschrittenen Spreitungsstadien wurden in drei morphologisch unterschiedliche Gruppen eingeteilt.
Etwa 20-35% der gespreiteten Monozyten, die im weiteren als "flache" Monozyten bezeichnet werden, wiesen einen verhältnismäßig großen Zelldurchmesser und eine dementsprechend große Projektionsfläche (vergl. Tabelle IV.4.) bei einer geringen Höhe von etwa 1,5 µm - selbst über dem Zellkern - auf (vergl. Abb.IV.12.). Ein weiteres Drittel der Monozytenpopulation, das im folgenden als die Fraktion "hoher" Monozyten bezeichnet wird, war durch einen relativ geringen Zelldurchmesser und somit durch eine kleine Projektionsfläche (vergl. Tabelle IV.4.) bei einer deutlichen Erhöhung von 2-4 µm über dem Zellkern gekennzeichnet (vergl. Abb. IV.13.). Eine Reihe von Übergangsformen zwischen diesen Extremen wurde in einer dritten Gruppe den "mittleren" Monozyten zusammengefaßt. Anhand der Kernhöhe war auch im Autoradiogramm eine zuverlässige Unterscheidung zwischen diesen Gruppen möglich. Sofern alle Silberkörner auf der Zellhälfte mit einer Fokusebene scharf abbildbar waren, wurden die Zellen der Gruppe der "flachen" Monozyten zugeteilt. Falls die Erfassung der Silberkörner auf der Zellhälfte erst durch drei Fokusebenen möglich war, sodaß die Silberkörner auf dem Plasmasaum nie gleichzeitig mit den Silberkörnern auf dem Kernplateau darzustellen waren, wurden diese Zellen der Gruppe der "hohen" Monozyten zugeteilt (vergl. Abb. IV.26).

In allen fortgeschrittenen Spreitungsstadien finden sich keine Zellausläufer mehr auf der Monozytenoberfläche. Diese Zellen weisen auch nach Trocknung der Ausstrichpräparate an Luft eine faltenfreie, weitgehend glatte Oberfläche auf, was durch transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Serienschnitten (Abb.IV.12.a & IV.13.a), aber auch durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Abb. IV.12.b & IV.13.b) belegt werden kann.

TABELLE IV.4.

DIE GRÖßENVERTEILUNG INNERHALB DER MONOZYTENGRUPPEN

Inkub. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	"flache" MZ n	"flache" MZ ZH (μm^2)	"mittlere" MZ n	"mittlere" MZ ZH (μm^2)	"hohe" MZ n	"hohe" MZ ZH (μm^2)
15	10^{-9}	33	320 ± 50	45	290 ± 50	22	260 ± 50
15	10^{-8}	24	300 ± 50	42	260 ± 50	34	250 ± 30
25	10^{-9}	22	290 ± 40	37	250 ± 50	41	220 ± 30
25	10^{-8}	22	300 ± 60	41	260 ± 50	37	250 ± 40
37	10^{-9}	30	320 ± 70	40	260 ± 60	30	220 ± 50
37	10^{-8}	22	280 ± 60	35	230 ± 60	43	180 ± 30

MZ = Monozyten, ZH = Zellhälfte

Die Angaben zur Oberfläche der Zellhälften beruhen auf den Bestimmungen der jeweiligen Projektionsflächen, die Zellhöhe wurde nicht berücksichtigt.

ABB.IV.12.

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER QUERSCHNITT EINES "FLACHEN" MONOZYTEN UND DIE ENTSPRECHENDE ZELLAUFSICHT IM RASTERELEKTRONENMIKROSKOP

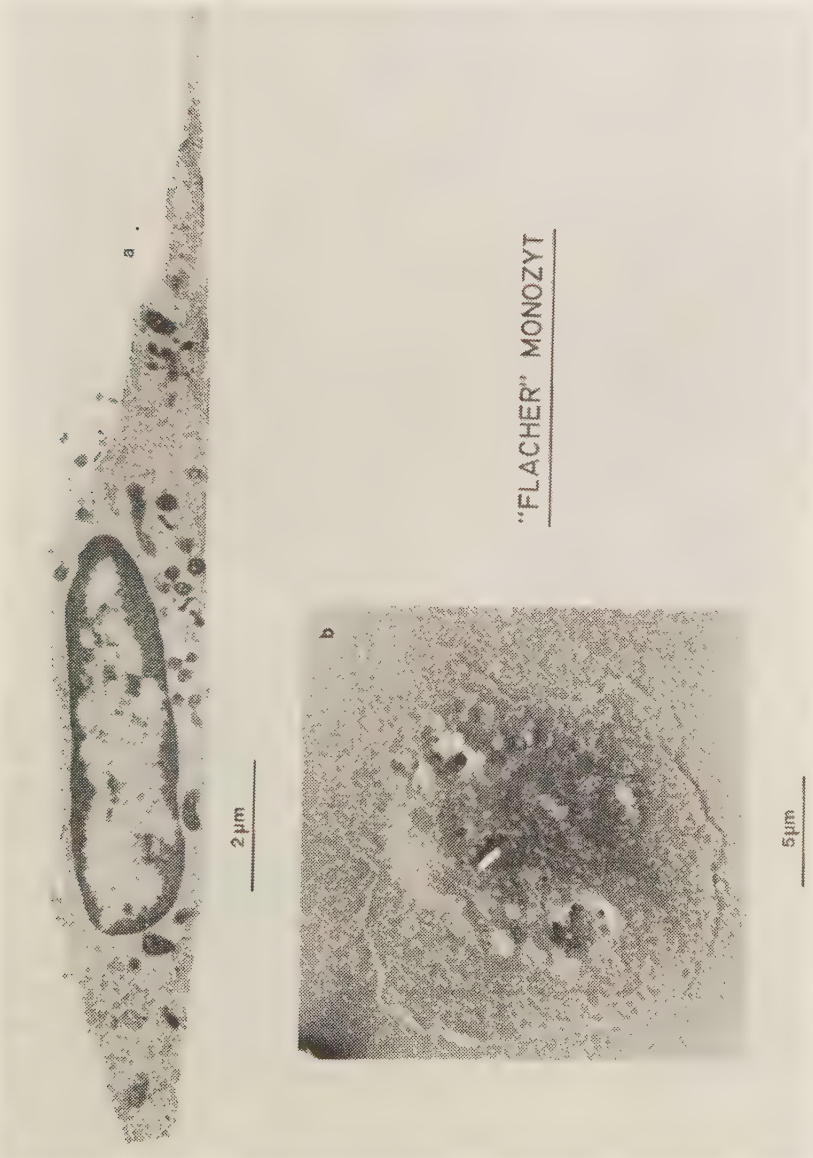
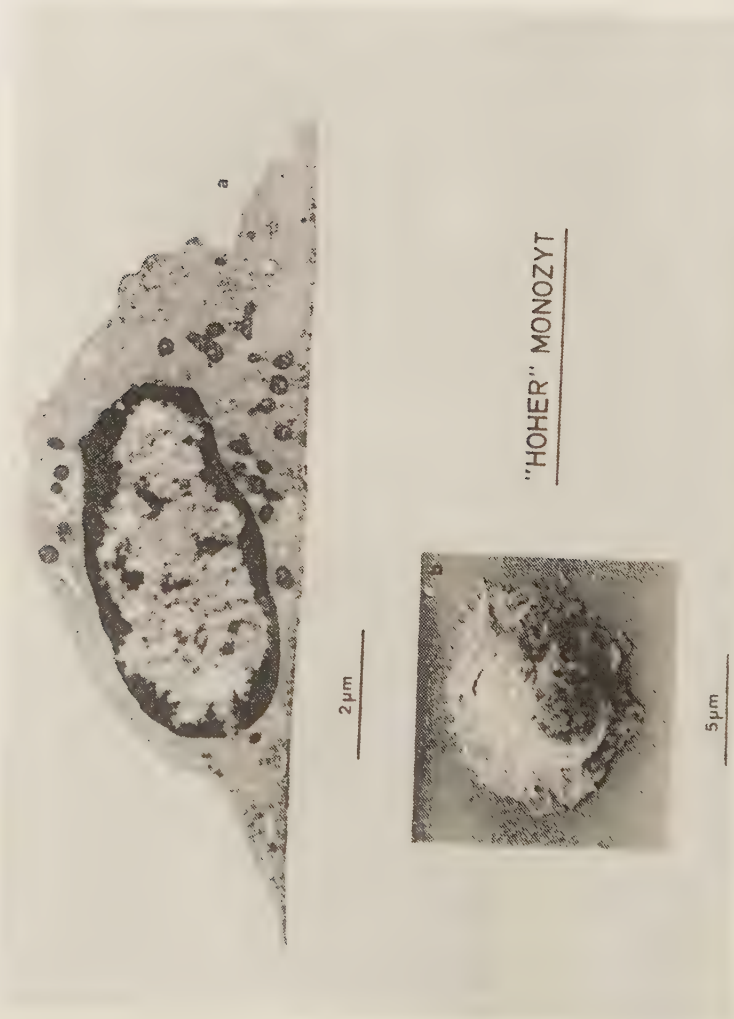


ABB.IV.13

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER QUERSCHNITT EINES "HOHEN" MONOZYTEN UND DIE ENTSPRECHENDE ZELLAUFSICHT IM RASTERELEKTRONENMIKROSKOP



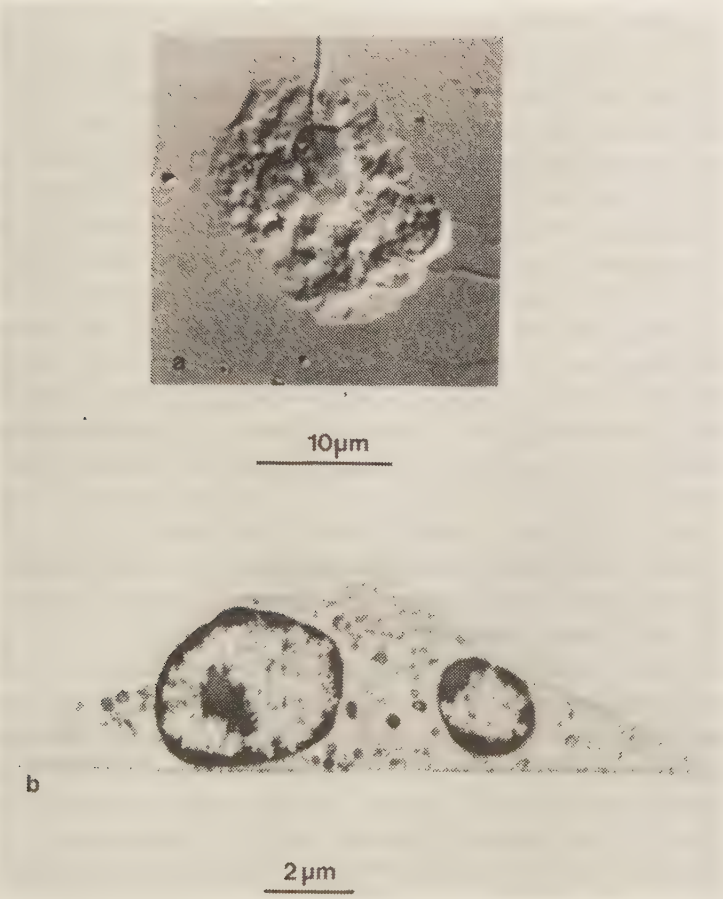


ABB.IV.14.
LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG EINES ZERSTÖRTEN GESPREITETEN MONOZYTEN

Im Zellaustrichpräparat (Abb.IV.14.a) sind die nicht intakten gespreiteten Monozyten im Interferenzkontrast an ihrer rauhen Oberfläche gut zu erkennen, im Autoradiogramm zeigen sie keine über den Emulsionshintergrund hinausgehende Markierung. Der elektronenmikroskopische Querschnitt (Abb.IV.14.b) zeigt, daß solchen Monozyten die Plasmamembran zum Teil fehlt.

Neben den Übergangsformen und den fortgeschrittenen Spreitungsstadien fanden sich im Zellausstrichpräparat außerdem gespreitete Monozyten mit einer charakteristischen rauhen oder gekörnten Oberfläche, die im Autoradiogramm keine über den Emulsionshintergrund hinausgehende Markierung aufwiesen (Abb. IV.14.a). Elektronenmikroskopische Querschnitte zeigten, daß diese Zellen nicht mehr intakt waren (Abb. IV.14.b). Da diesen Monozyten Teile der oberen Hälfte der Plasmamembran fehlte, wurde angenommen, daß es sich um Zellen handelt, die während der Präparation der Zellausstrichpräparate mechanisch geschädigt wurden. Sie waren gut von intakten Monozyten zu differenzieren und wurden wie die Übergangsformen nicht in die Auswertung einbezogen.

Aus den morphologischen Parametern lassen sich die geometrischen Beziehungen im autoradiographischen Präparat zwischen Objekt und Detektorschicht ableiten.
Bei allen gespreiteten Monozyten ist die gesamte Plasmamembranfläche der oberen Zellhälfte in engem Kontakt mit dem Stripping-Film. So entsprechen sich die Plasmamembranfläche und die sie bedeckende Fläche der Detektorschicht. Aufgrund der geringen Höhe der "flachen" gespreiteten Monozyten ist die bei der lichtmikroskopischen Abbildung bestimmte Projektionsfläche ein direktes Maß für die Plasmamembranfläche dieser Zellen. Bei "hohen" Monozyten wird die Plasmamembranfläche wegen der im Vergleich zu den "flachen" Monozyten größeren Erhebung über dem Kern (2-4 µm) leicht unterschätzt, wenn die Projektionsfläche als Maß für die Plasmamembranfläche verwendet wird. Unter Annahme einer Kugelgeometrie im Kernbereich ließ sich diese Unterschätzung berechnen. Sie betrug bei den meisten "hohen" Monozyten zwischen 5 und 10% und wurde bei den Auswertungen vernachlässigt.
Die Präparatgeometrie in Testpräparaten zur Bestimmung der autoradiographischen Empfindlichkeit ist diesen geometrischen Verhältnissen ähnlich (SEMMLER und JUNGER 1986), sodaß die dort ermittelten Empfindlichkeitswerte übertragbar sind. Damit-

wird eine quantitative Auswertung der Autoradiogramme gespreiteter Monozyten möglich.
Bei kugelförmigen Monozyten, die in Suspension fixiert wurden, und bei Lymphozyten überspannte der Stripping-Film das faltenreiche Oberflächenrelief und bedeckte kalottenartig nur noch Teilbereiche der Plasmamembranfläche. Aus der in der lichtmikroskopischen Abbildung bestimmten Projektionsfläche kann zwar unter Annahme einer einfachen Kugelgeometrie und Berücksichtigung der Zellhöhe die Fläche der Detektorschicht berechnet werden, aber die Fläche der Plasmamembran läßt sich aufgrund der Reliefbildung nicht mehr abschätzen. Auf diese Präparatgeometrie sind die von SEMMLER und JUNGER (1986) beschriebenen Empfindlichkeitswerte (siehe: Kapitel III.3., Seite 31) nicht mehr anwendbar.
Zieht man die unterschiedlichen Reichweiten der 125I-Elektronen in Betracht (siehe: Tabelle III.2., Seite 32), so werden bei gleicher Strahlquellendichte in der Plasmamembran von der aufgefalteten Zelloberfläche des kugelförmigen Monozyten weniger Elektronen die Photoschicht erreichen als von der glatten Oberfläche der gespreiteten Zelle. Theoretisch ist somit eine unterschiedliche Zählausbeute, d.h. eine unterschiedliche Anzahl an Silberkörnern pro Anzahl Zerfälle, zu erwarten. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden bei Parallelproben die Expositionszeiten der Autoradiogramme so gewählt, daß bei Präparaten kugelförmiger und gespreiteter Monozyten annähernd vergleichbare Zerfallsraten vorlagen (vergl.: Bspl. zur Berechnung der Zerfallsraten Tabelle IV.4.).
Die vergleichenden Untersuchungen zeigten, daß die Zählausbeuten auf der äquivalenten Oberfläche bei gespreiteten Monozyten reproduzierbar knapp doppelt so hoch wie bei kugelförmigen Monozyten waren (vergl. Tabelle IV.5.). Auf der Zellhälfte kugelförmiger Monozyten fanden sich unabhängig von den Inkubationsbedingungen im Mittel nur 55 $\pm$ 14% (n=15) der Silberkörner, die gespreitete Monozyten unter vergleichbaren Bedingungen aufwiesen.

Bei Lymphozyten ist anzunehmen, daß aufgrund ihrer weniger strukturierten Oberfläche die Verluste in der Zählausbeute kleiner sind; sie können allerdings nicht bestimmt werden.

TABELLE IV.4.
BEISPIEL FÜR DIE BERECHNUNG DER STRAHLUNGSDOSIS D_x

Inkubationstemperatur:	37°C
Inkubationsdauer:	1h
Insulinkonzentration:	10^{-9} mol/l
spez. Aktivität des 125I-Insulins:	4000 dpm/mol^{-15}
Totalbindung:	3000 dpm/10^6 Monozyten
D_0 (Insulinbindung/Monozyt):	$3{,}00 * 10^{-3}$ dpm/Monozyt
Zelloberfläche des gespreiteten Monozyten:	500 μm^2
Halbwertszeit des 125I-Isotops:	60 Tage

Aus diesen Angaben läßt sich mit der Formel (1) (Kapitel III.3.3., Seite 31) für beliebige Expositionszeiten die Strahlungsdosis pro Monozyt oder Monozytenoberfläche berechnen. Das Ansteigen der Strahlungsdosis mit zunehmender Expositionszeit wird an drei Beispielen aufgezeigt.

Expositionszeit =	30	Tage:	110	Zerfälle/Monozyt	=	0,21	Zerfälle/μm^2
" =	60	" :	190	"	"	=	0,37	" "
" =	120	" :	280	"	"	=	0,56	" "

TABELLE IV.5.

ZÄHLAUSBEUTE AUF DER ZELLOBERFLÄCHE KUGELFÖRMIGER UND GESPREITETER MONOZYTEN

Exp. nr.	Strahlungsdosis D_x /10^7 mLkz. kugelf.MZ	gespr.MZ	Verhältnis D_x kugelf.MZ : D_x gespr.MZ	SK/ZH ± s* kugelf.MZ	gespr.MZ	Verhältnis SK kugelf.MZ :SK gespr.MZ
1	$4,9*10^8$	$5,8*10^8$	1 : 1,17	16,5± 5,7	29,9± 9,1	1 : 1,81
2	$2,7*10^8$	$2,9*10^8$	1 : 1,07	15,9± 7,6	30,8± 9,7	1 : 1,94
3	$2,6*10^8$	$2,5*10^8$	1 : 0,94	22,5± 9,0	38,2±11,3	1 : 1,70

mLkz. = mononukleäre Leukozyten, kugelf. MZ = kugelförmige Monozyten, gespr. MZ = gespreitete Monozyten, SK = Silberkörner, ZH = Zellhälfte

Die Strahlungsdosis D_x, die die 125I-Zerfälle innerhalb der Expositionszeit angibt, wurde aus der Radioaktivitätsmessung im γ-counter und der gewählten Expositionszeit mit der Formel (1) (Kapitel III.3.3., Seite 31) berechnet. Sie wurde auf 10^7 mononukleäre Leukozyten normiert, wobei der mittlere Monozytengehalt der drei Experimente bei 13% lag.
Die Dissoziation des 125I-Insulins bei der Präparation gespreiteter Monozyten wurde berücksichtigt; vor der Bestimmung der Strahlungsdosis D_x wurde bei den Autoradiogrammen gespreiteter Monozyten die jeweilige Dissoziationsrate (im Mittel 23%) von der via Radioaktivitätsmessung bestimmten Insulinbindung subtrahiert.
Die drei Experimente wurden so ausgewählt, daß annähernd gleiche Strahlungsdosen im entwickelten Autoradiogramm vorlagen; bei allen Experimenten wurde MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin als Tracer eingesetzt.

Nicht nur die Oberflächenstruktur, sondern auch die Höhe der der kugelförmigen Monozyten übt einen ungünstigen Einfluß auf die Lokalisation plasmamembranständiger Signale aus.
Im Zellausstrichpräparat liegt der kugelförmige Monozyt als kleines Ellipsoid (Ø ~ 8 µm) mit einer Höhe von 5-6 µm vor (vergl. Abb.III.2.a., Seite 33), sodaß die Auswertungsfläche, die obere Zellhälfte, eine beträchtliche Krümmung aufweist. Projektionseffekte sind daher nur in einem kleinen, etwa 20 μm^2 großen Areal auf dem obersten Zellplateau zu vernachlässigen. Auf der restlichen Auswertungsfläche nehmen diese Effekte infolge der stärkeren Krümmung der Zelloberfläche gegen den Zellrand deutlich zu. So können Silberkörner, die auf der Zelloberfläche keinen Kontakt zueinander haben, in der Superposition nahe beieinander liegen. Die Abbildung IV. 15.a stellt die Auswirkung des Projektionseffekts schematisch dar.
Bei den gespreiteten Monozyten wird die autoradiographische Lokalisation der Insulin-Rezeptor-Komplexe wegen der geringen Höhe der Zellen durch Projektionseffekte vor allem bei der Gruppe der "flachen" Monozyten nicht beeinflußt (vergl. Abb. IV.15.b).

Aus den vorgestellten Beobachtungen wurden für die Autoradiographie der Zellausstrichpräparate folgende Konsequenzen gezogen:
Nur anhand von Autoradiogrammen gespreiteter Monozyten können Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Zelloberfläche lokalisiert und quantitativ bestimmt werden. Um die Bindungsunterschiede von Monozyten und Lymphozyten zu untersuchen können entweder gespreitete oder kugelförmige Monozyten mit Lymphozyten verglichen werden. In keinem Fall ist jedoch die Präparatgeometrie kompatibel. Da alle quantitativen Bestimmungen an gespreiteten Monozyten durchgeführt wurden, sind diese Zellen und die Lymphozyten unter Vernachlässigung einer nicht allzubedeutenden Unterschätzung der Lymphozytenbindung in Relation gesetzt worden.

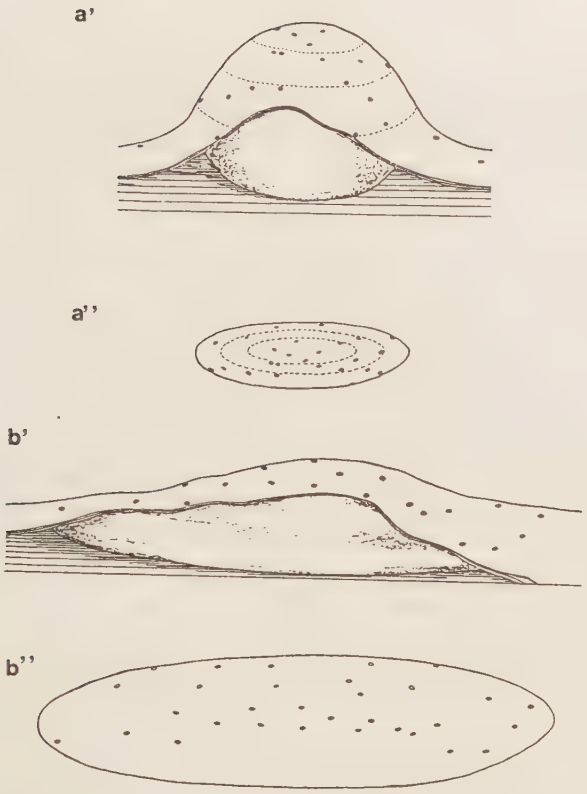


ABB.IV.15.
AUSWIRKUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN ZELLGESTALT DES KUGELFÖRMIGEN BZW. DES GESPREITETEN MONOZYTEN AUF DIE AUTORADIOGRAPHISCHE AUSWERTUNG

Die geometrischen Verhältnisse bei der Auswertung von Autoradiogrammen mit kugelförmigen (a) oder "flachen" gespreiteten (b) Monozyten werden schematisch aufgezeigt. Im jeweils oberen Teil der Abbildung (a', b') sind die mit dem Stripping-Film bedeckten Zellen und jeweils darunter die entsprechenden Projektionsebenen (a'', b'') dargestellt, wobei die drei Fokusebenen, die zur Erfassung der Silberkörner auf der Zellhälfte des kugelförmigen Monozyten notwendig sind, ebenfalls eingezeichnet wurden. Der durch die stark gekrümmte Oberfläche der kugelförmigen Zelle hervorgerufene Projektionseffekt, der die exakte Lokalisation der Silberkörner beeinträchtigt, wird in der Darstellung IV.15.a deutlich.

IV.4. AUTORADIOGRAPHISCHER NACHWEIS VON 125I-INSULIN BZW. 125I-INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEXEN AUF MONOZYTEN UND LYMPHOZYTEN

Die Bestimmung oder Abschätzung folgender Parameter war mit den bezüglich Inkubationstemperatur und Insulinkonzentration variierenden autoradiographischen Experimenten möglich:

- Monozyten zeigten im Ansatz der Totalbindung eine 10-30-fach höhere Silberkorndichte als Lymphozyten.
- Bei Lymphozyten war 40-50% des Gesamtsignals auf unspezifische Bindung zurückzuführen, bei Monozyten umfasste die unspezifische Bindung 2-4% bei 10^{-9} mol Insulin/l, bzw. 10-20% bei 10^{-8} mol Insulin/l.
- Die Bindungsanteile zwischen den beiden Zellfraktionen der Mischpopulation konnten abgeschätzt werden; auf die Monozytenfraktion (10-20% der Mischpopulation) entfielen etwa 80%, auf die Lymphozyten (80-90% der Mischpopulation) die restlichen 20% des gesamt gebundenen Insulins.
- Die Prüfung auf Subpopulationen innerhalb der Monozytenfraktion erwies, daß die Monozyten in Bezug auf ihre Insulinbindungsfähigkeit homogen sind.
- Die mittlere Anzahl von plasmamembranständigen Insulin-Rezeptor-Komplexen auf gespreiteten Monozyten wurde berechnet. Im Ansatz der Totalbindung fanden sich zwischen 400 (15°C) und 200 (37°C) 125I-Insulinmoleküle im niedrigeren Insulinkonzentrationsbereich und zwischen 500 (15°C) und 300 (37°C) 125I-Insulinmoleküle im höheren Konzentrationsbereich.

- Der vom Monozyten internalisierte Anteil an 125I-Insulin wurde geschätzt, er betrug in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen 20-37% des gesamt gebundenen Insulins.
- Die Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auf Monozyten wurde auf Zufälligkeit überprüft. Mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin ergaben sich im niedrigeren Insulinkonzentrationsbereich für 90% der Monozyten zufällige Silberkorn- bzw. Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen und nur bei etwa 10% der Monozyten wurden segregierte Verteilungen beobachtet. Im höheren Insulinkonzentrationsbereich stieg der Anteil an segregierten Verteilungen auf knapp 30%.

Der Fülle des Datenmaterials Rechnung tragend, werden im folgendem Meßdaten nur von einigen Einzelversuchen als Beispiele aufgeführt. Ausgehend davon, daß bei vergleichbaren Probengeometrien die Zählausbeuten reproduzierbar waren, wurden die aus dem autoradiographischen Signal berechneten Bindungsdaten bei Parallelversuchen gemittelt. Die gesamten Versuchsreihen werden unter Verwendung dieser Daten tabellarisch zusammengefaßt.

Das Hauptgewicht der autoradiographischen Studien lag aufgrund der Probleme, die in der Morphologie der kugelförmigen Monozyten begründet waren, bei den gespreiteten Monozyten. Sofern sich bei den Autoradiogrammen von kugelförmigen Monozyten zusätzliche Informationen ergaben, wird darauf hingewiesen.

IV.4.1. RELATIVE BINDUNGSANTEILE VON MONOZYTEN UND LYMPHOZYTEN

Um die Bindungskapazitäten der Monozyten im Verhältnis zu den Lymphozyten abschätzen zu können, wurden bei allen autoradiographischen Experimenten die Silberkörner, die sich im Ansatz der Totalbindung und der unspezifischen Bindung auf der Zellhälfte von Lymphozyten und gespreiteten oder kugelförmigen Monozyten finden, gezählt. Einige Beispiel für diese autoradiographischen Meßdaten wurden in der Tabelle IV.5. für die Population der gespreiteten Monozyten und in der Tabelle IV.6. für die Lymphozytenpopulation zusammengestellt.

Unabhängig von den Inkubationbedingungen war das autoradiographische Signal der Totalbindung auf dem einzelnen Lymphozyten im Vergleich zum gespreiteten Monozyten gering (vergl. Abb. IV.16 und Tabellen IV.5. und 6.). Im Ansatz der Totalbindung lag, auf die Zellhälfte bezogen, beim Lymphozyten eine um den Faktor 10 bis 30 niedrigere Silberkorndichte als

beim Monozyten vor.
Zwischen 40 und 50% des Signals der Totalbindung auf den Lymphozyten war auf unspezifisch gebundenes Insulin zurückzuführen (vergl. Tabelle IV.6.), trotz größer Streubreiten können pro Lymphozyt einige wenige spezifische Insulinbindungsstellen (5-25/Lymphozyt) angenommen werden.
Beim Monozyten hingegen repräsentiert der größte Teil des Signals der Totalbindung spezifische Insulinbindungsstellen. Das Ausmaß der unspezifischen Bindung war abhängig von den Inkubationsbedingungen. Im niedrigeren Insulinkonzentrationsbereich (bis 10^{-9} mol/l) umfaßte das Signal der unspezifischen Bindung nur 2-4% der Totalbindung, stieg aber im unphysiologischen Konzentrationsbereich (10^{-8} mol/l) bei Inkubationstemperaturen von 15 und 25°C auf etwa 10% und bei 37°C auf etwa 20% an (vergl. Tabelle IV.5. und Abb. IV.17.).
Unbeeinflußt von der verminderten Zählausbeute war das Verhältnis von Totalbindung zu unspezifischer Bindung auf den kugelförmigen Monozyten demjenigen der gespreiteten Monozyten vergleichbar.

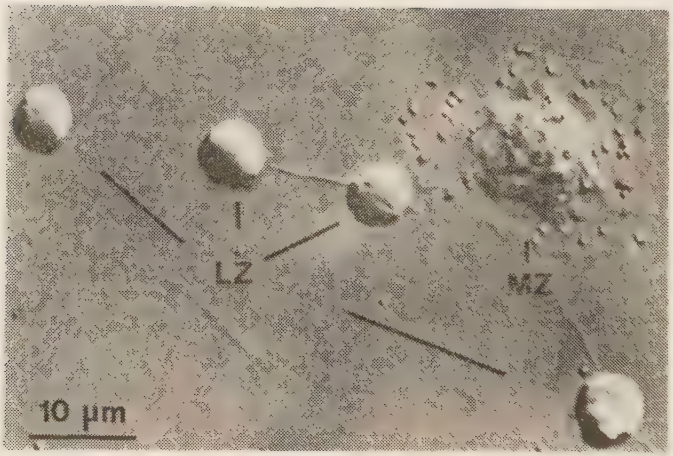


ABB.IV.16.

DAS SIGNAL DER TOTALBINDUNG IM VERGLEICH ZWISCHEN MONOZYT UND LYMPHOZYT

Der Unterschied zwischen Monozyt und Lymphozyt in der auf der Zelloberfläche vorliegenden Silberkorndichte wird an einem Beispiel dargestellt. Neben einem deutlich markierten, gespreiteten Monozyten (MZ) finden sich einige meist nicht mehr als ein Silberkorn aufweisende Lymphozyten (LZ). Folgende Inkubationsbedingungen lagen vor:
$55{,}0 * 10^{6}$ mononukleäre Leukozyten (10% Monozyten) wurden mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin einer spezifischen Aktivität von 320 µCi/µg und einer Konzentration von $1 * 10^{-8}$ mol/l bei 25°C für 1h inkubiert.

TABELLE IV.5.

AUTORADIOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DER TOTALBINDUNG EINSCHLIEßLICH DES DURCH HOCHENERGETISCHE ELEKTRONEN VERURSACHTEN SIGNALANTEILS SOWIE DER UNSPEZIFISCHEN BINDUNG AUF GESPREITETEN MONOZYTEN

Inkub. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	Expos. zeit (d)	Totalbindung SK/ZH ± s	durch hochenergetische Elektronen verursachter Signalanteil SK/ZH ± s	(% bez. auf TB)	unspezifische Bindung SK/ZH ± s	(% bez. auf TB)
15	10^{-9}	48	46,3 ± 16,0	5,1 ± 2,4	11,0%	0,2 ± 0,1	0,4%
15	10^{-9}	70	21,9 ± 8,8	2,8 ± 2,0	12,6%	0,7 ± 0,5	3,2%
15	10^{-8}	70	65,5 ± 19,0	11,2 ± 5,5	17,1%	7,7 ± 6,8	11,8%
25	10^{-9}	50	30,0 ± 9,2	2,2 ± 1,4	7,4%	0,2 ± 0,2	0,6%
25	10^{-9}	40	22,0 ± 7,3	2,6 ± 2,2	12,0%	0,4 ± 0,4	1,6%
25	10^{-8}	25	30,8 ± 9,7	4,3 ± 2,4	14,0%	3,4 ± 1,8	11,0%
37	10^{-9}	77	38,2 ± 5,5	5,5 ± 2,4	14,5%	0,7 ± 0,5	1,8%
37	10^{-9}	68	33,6 ± 5,1	5,0 ± 2,4	15,0%	1,0 ± 0,5	3,0%
37	10^{-8}	51	36,4 ± 11,0	5,9 ± 3,9	16,2%	6,4 ± 4,5	18,8%

MZ = Monozyt, SK = Silberkorn, ZH = Zellhälfte, TB = Totalbindung, d = Tage.

Bei allen dargestellten Beispielen wurde MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin als Tracer verwendet. Alle angegebenen Silberkorndichten sind um den jeweiligen Emulsionshintergrund korrigiert.

TABELLE IV.6.

AUTORADIOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DER TOTALBINDUNG UND DER UNSPEZIFISCHEN BINDUNG AUF DER ZELLHÄLFTE DER LYMPHOZYTEN

Inkub. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	Expos. zeit (Tage)	Totalbindung SK/ZH ± s	unspezifische Bindung SK/ZH ± s	unspezifische Bindung % der TB
15	10^{-9}	48	1,4 ± 1,4	0,7 ± 1,0	50,0
15	10^{-9}	70	1,2 ± 1,2	0,6 ± 0,8	46,2
15	10^{-8}	70	2,7 ± 1,8	1,4 ± 1,3	51,9
25	10^{-9}	50	0,7 ± 1,0	0,3 ± 0,4	47,1
25	10^{-9}	40	1,0 ± 1,3	0,6 ± 0,8	55,4
25	10^{-8}	25	0,9 ± 1,3	0,3 ± 0,4	30,3
37	10^{-9}	77	0,7 ± 0,8	0,2 ± 0,4	33,3
37	10^{-9}	68	0,9 ± 0,8	0,3 ± 0,3	31,0
37	10^{-8}	51	0,7 ± 0,7	0,3 ± 0,3	46,2

SK = Silberkörner, ZH = Zellhälfte, TB = Totalbindung

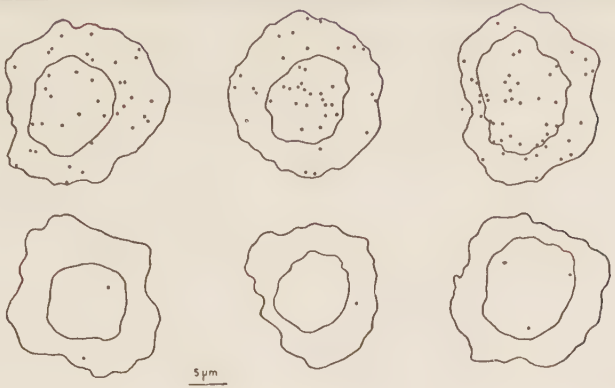
Es wurden dieselben Experimente wie in Tabelle IV.5. aufgeführt. Die Silberkorndichten waren jeweils um den Emulsionshintergrund korrigiert.

ABB.IV.17.

BEISPIELE FÜR DAS SIGNAL DER TOTALBINDUNG UND DER UNSPEZIFISCHEN BINDUNG AN GESPREITETEN MONOZYTEN

TOTALBINDUNG

UNSPEZIFISCHE BINDUNG



Inkubationsbedingungen:	15°C/1h/10^{-9}mol/l	25°C/1h/10^{-9}mol/l	37°C/1h/10^{-9}mol/l
TB : SK/ZH ± s*	43,8 ± 12,1	41,1 ± 12,9	52,3 ± 16,4
NSB: SK/ZH ± s*	2,1 ± 1,6	1,1 ± 0,7	3,4 ± 4,3
(%)	(5,3%)	(2,7%)	(6,5%)
EH : SK/ZH ± s	1,0 ± 0,9	2,1 ± 2,8	2,0 ± 2,6
(%)	(2,2%)	(4,9%)	(3,6%)

TB = Totalbindung, NSB = unspezifische Bindung, EH = Emulsionshintergrund, SK = Silberkörner, ZH = Zellhälfte.

* Die angegebenen Silberkorndichten wurden jeweils um den Emulsionshintergrund korrigiert. Autoradiogramme gespreiteter Monozyten von Zellausstrichpräparaten der Totalbindung und der unspezifischen Bindung werden gegenübergestellt. Die über 200 Monozyten gemittelten autoradiographischen Meßdaten werden zu jedem Beispiel ebenfalls angegeben. Superpositionen von 2-3 Fokusebenen wurden als Darstellungsform gewählt, um eine Übersicht über die pro Zellhälfte vorliegende Anzahl an Silberkörnern zu geben.

Das Verhältnis der auf die Zellhälften normierten Silberkorndichten von Monozyten und Lymphozyten wurde benutzt, um die Bindungsanteile der Monozyten- bzw. der Lymphozytenfraktion an der Insulinmenge abzuschätzen, die sich aus der Radioaktivitätsmessung im γ-counter ergab.
Die Tabelle IV.7. stellt an drei Beispielen das Vorgehen bei der Abschätzung dar. Die Tabelle IV.8. faßt die Bindungsbeteiligung in der Mischpopulation für alle Inkubationsbedingungen zusammen.
Von der im Totalbindungsansatz gemessenen Insulinmenge entfielen 80-90% auf die Monozytenfraktion, die etwa 10-20% der mononukleären Leukozyten ausmacht. Obwohl der einzelne Lymphozyt 10-30 mal weniger Insulin gebunden hat, umfaßte die Fraktion der Lymphozyten, da sie den Hauptanteil der Mischpopulation bildet, immerhin 10-20% der gesamt gebundenen Insulinmenge.

Da das autoradiographisch bestimmte Signal der unspezifischen Bindung im niedrigeren Insulinkonzentrationsbereich (bis 10^{-9} mol/l) nur 2-4% der Totalbindung ausmachte, entfielen auch innerhalb der Mischpopulation nur 20-30% der im γ-counter bestimmten Radioaktivität auf die Monozyten.
Bei unphysiologisch hohen Hormonkonzentrationen (10^{-8} mol/l) nahm die unspezifische Bindung der Monozyten deutlich zu, sodaß von der an der Mischpopulation bestimmten Menge an unspezifisch gebundener Radioaktivität zwischen 50 und 80% auf die Monozyten entfielen.
Die in den Tabellen IV.7 und 8. vorgestellten Bindungsdaten wurden aus Experimenten gewonnen, bei denen MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin verwendet wurde. Die prozentualen Bindungsbeteiligungen der Monozyten und der Lymphozyten lagen aber auch bei der Verwendung des RANDOM-markierten Insulin in der gleichen Größenordnung.

Die allgemein übliche Normierung der Bindungsdaten auf die Monozyten, ohne die Lymphozytenbeteiligung zu berücksichtigen, führt demnach zu einer Überschätzung der Bindungsstellen auf den Monozyten. Bei Bilanzen zwischen den Insulinbindungsdaten, die aus der Autoradiographie bzw. aus den Radioaktivitätsmessungen im γ-counter gewonnen wurden, wurde daher im folgenden der Bindungsanteil der Lymphozyten berücksichtigt.

TABELLE IV.7.

BEISPIELE ZUR ABSCHÄTZUNG DER BINDUNGSBETEILIGUNG VON MONOZYTEN UND LYMPHOZYTEN IN DER GESAMTPOPULATION

				autoradiographische Bestimmung				Radioaktivitätsmessung im γ-counter				
									Korrektur der Insulinbindung durch die Autoradiographie			
Inkub.-temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	spez.Akt. (dpm/ mol*10^{-15})	MZ (%)	SK/ZH MZ	SK/ZH LZ	Verhältnis SK/ZH MZ : SK/ZH LZ	Bindungs-beteilig. MZ : LZ	dpm/ 10^7 m.Lkz.	Insulin geb. (Totalbindung) mol * 10^{-15} MZ	Insulin geb. (Totalbindung) mol * 10^{-15} LZ	Moleküle MZ	Moleküle LZ
15	10^{-9}	4130	24	46,8	1,4	1:0,03	91%: 9%	14300	1,31	0,04	788	25
25	10^{-9}	3810	9	30,0	0,7	1:0,02	81%:19%	4980	1,18	0,03	706	16
37	10^{-9}	4130	10	33,6	0,9	1:0,03	81%:19%	5890	1,15	0,03	693	18

spez. Akt. = spezifische Aktivität, dpm = Zerfälle/min, MZ = Monozyt, LZ = Lymphozyt, ZH = Zellhälfte, m.Lkz. = mononukleäre Leukozyten.

Bei allen in der Tabelle IV.7. aufgeführten Experimenten wurde MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin verwendet. Die Silberkorndichte auf der Zellhälfte der Monozyten wurde an Autoradiogrammen gespreiteter Monozyten bestimmt, da die Zählausbeute auf kugelförmigen Monozyten aufgrund der stark gefalteten Oberfläche vermindert war (vergl. Kapitel IV.3. Seite 87).

TABELLE IV.8.

MITTLERE PROZENTUALE BINDUNGSBETEILIGUNG VON MONOZYTEN UND LYMPHOZYTEN AN DER INSULINBINDUNG

			Totalbindung			unspezif. Bindung		
			Autoradiogr. Bestimmung	Radioakt.messung Korrektur mit AR		Autoradiogr. Bestimmung	Radioakt.messung Korrektur mit AR	
Inkub. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	n	Bindungsbet. MZ : LZ (%) (%)	Insulinmoleküle MZ	LZ	Bindungsbet. MZ : LZ (%) (%)	Insulinmoleküle MZ	LZ
15	10^{-9}	4	85% : 15%	748 ± 218	20 ± 6	16% : 84%	7 ± 5	6 ± 2
15	10^{-8}	4	85% : 15%	1098 ± 227	53 ± 24	52% : 48%	127 ± 63	28 ± 14
25	10^{-9}	3	81% : 19%	696 ± 155	24 ± 14	19% : 81%	10 ± 8	8 ± 5
25	10^{-8}	3	78% : 22%	1083 ± 68	37 ± 18	51% : 49%	202 ± 73	19 ± 3
37	10^{-9}	5	82% : 18%	526 ± 250	16 ± 11	29% : 71%	33 ± 14	13 ± 8
37	10^{-8}	1	89% : 11%	601	21	77% : 23%	335	15

MZ = Monozyt, LZ = Lymphozyt, AR = Autoradiographie, n = Anzahl der autoradiographischen Bestimmungen
Bei allen in der Tabelle IV.8. aufgeführten Experimenten wurde MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin als Tracer verwendet. Die Silberkorndichte auf der Zellhälfte der Monozyten wurde an Autoradiogrammen gespreiteter Monozyten bestimmt, da die Zählausbeute auf kugelförmigen Monozyten aufgrund der stark gefalteten Oberfläche vermindert war (vergl. Kapitel IV.3., Seite 87).

IV.4.2. PRÜFUNG AUF MONOZYTEN-SUBPOPULATIONEN

Die Monozyten ließen sich, andere Oberflächenrezeptoren betreffend, in Subpopulationen einteilen; so fanden sich Monozytenfraktionen, die einen unterschiedlichen Besatz mit Fc-Rezeptoren, Komplementrezeptoren oder MHC Klasse II Antigenen aufwiesen (WEINER 1982). Es war daher naheliegend zu prüfen, ob auch bezüglich der Insulinrezeptoren Monozytensubpopulationen mit unterschiedlichen Rezeptorkonzentrationen vorlagen. Neben ihrer biologischen Bedeutung war die Klärung dieser Frage auch für die Behandlung des Datenmaterials wichtig, da Angaben über mittlere Silberkorndichten bzw. über daraus berechnete Rezeptordichten nur zulässig sind, sofern sich die Monozytenpopulation als homogen bezüglich der Ausstattung mit besetzten Insulinrezeptoren erweist.
Aus Kollektiven von je 100 oder 200 Monozyten wurden Verteilungskurven erstellt, indem zum einem die absoluten Häufigkeiten der auf der Zellhälfte vorliegenden Anzahl an Silberkörnern, zum anderen die auf eine Projektionsfläche von 200 μm^2 normierten Silberkorndichten aufgetragen wurden.
Die jeweiligen empirischen Verteilungen der Silberkörner bzw. Insulinbindungsstellen in der Monozytenpopulation wurden auf ihre Anpassung an eine Poisson-Verteilung bzw. eine Gaussche Normalverteilung getestet.
Zur Prüfung der Übereinstimmung zwischen empirischer und theoretischer Verteilung wurde der χ^2-Anpassungstest eingesetzt, mit dem sich im allgemeinen auch Verteilungsirregularitäten, wie sie durch das Vorliegen von zwei Subpopulationen auftreten könnten, zufriedenstellend nachweisen lassen (SACHS 1978).

Die Poissonverteilung: $P(x/\lambda) = \frac{\lambda^x * e^{-\lambda}}{x!}$

wird durch den Parameter λ vollständig charakterisiert; er steht für die Dichte der Zufallspunkte innerhalb einer gege-

benen Einheit und ist zugleich Mittelwert und Varianz.
Der χ^2-Anpassungstest verwarf für alle Silberkornverteilungen die Hypothese, daß sich die empirische Verteilung durch eine Poisson-Verteilung beschreiben läßt. Dies bezog sich nicht nur auf die Anzahl der Silberkörner bzw. Insulin-Rezeptor-Komplexe pro Zellhälfte, sondern auch auf die Verteilung der Silberkorndichten, die auf eine konstante Projektionsfläche von 200 μm^2 normiert waren (vergl. Abb.IV.18.a und b).

Bei allen betrachteten Kurvenverläufen war das arithmetische Mittel jeweils größer als der die Verteilung in zwei gleichgroße Hälften teilende Median, sodaß eine typische Kurvenform mit positiver Schiefe vorlag.
Da die empirischen Verteilungen einen durch die große Standardabweichung gekennzeichneten wesentlich flacheren Kurvenverlauf zeigten als für eine Poisson-Verteilung charakteristisch ist, lag nahe, auf die Anpassung an eine Gaussche Normalverteilung zu prüfen.

Die Normalverteilung: $W(x/\mu,\sigma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} * e^{-1/2 * (\frac{x-\mu}{\sigma})^2}$

ist in ihrer Lage durch den Mittelwert μ und in ihrer Form durch die Standardabweichung σ gekennzeichnet.
Der χ^2-Anpassungstest gilt auch als ein zuverlässiges Kriterium zur Prüfung auf Normalität einer gegebenen Verteilung.

Sowohl bei den kugelförmigen als auch bei den gespreiteten Monozyten erwies sich die Population bezüglich der Anzahl an Silberkörnern bzw. Insulin-Rezeptor-Komplexen pro Zellhälfte als normalverteilt. Während bei kugelförmigen Zellen auch bezüglich der Silberkorndichte pro Einheitsfläche eine Anpassung an eine Normalverteilung gefunden wurde, war bei den gespreiteten Monozyten in fast 30% der Fälle die beobachtete Verteilung nicht durch eine Normalverteilung zu beschreiben (vergl. Abb.IV.18.b).

Die Ursache des Abweichens von einer Normalverteilung ließ sich bei der Einteilung der Monozytenpopulation in "flache", "mittlere" und "hohe" Zellen klären (vergl. Kapitel IV.3., Seite 81.).
Die Analyse der Autoradiogramme zeigte, daß die "flachen" und die "hohen" Monozytengruppen im Mittel eine jeweils gleich große Anzahl an Silberkörnern auf der Zellhälfte aufwiesen. Infolge der kleineren Projektionsfläche der "hohen" Monozyten (vergl. Tabelle IV.4., Seite 82) nahm die auf eine konstante Fläche (200 μm^2) normierte Silberkorndichte bei diesen Zellen leicht, aber nicht signifikant zu (vergl.Tabelle IV.9.) Innerhalb jeder der drei Untergruppen der gespreiteten Monozyten ergaben die Verteilungskurven, die aus den beobachteten Häufigkeiten der auf eine konstante Projektionsfläche von 200 μm^2 normierten Silberkörner erstellt wurden, eine Anpassung an eine Gaussche Normalverteilung.
Die höhere Dichte der auf eine Projektionsfläche von 200 μm^2 normierten Silberkörner in der Gruppe der "hohen" Monozyten könnte zum Teil auf einer Unterschätzung der Plasmamembranfläche durch die Vernachlässigung der Erhebung über dem Zellkern beruhen (vergl. Kapitel IV.3., Seite 86). Darüberhinaus gibt es Hinweise darauf, daß die "hohen" Monozyten ein früheres Spreitungsstadium als die "flachen" Monozyten darstellen (vergl. Kapitel IV.5.2.1., Seite 136). Dementsprechend hätte die Plasmamembran der "hohen" Monozyten den maximal möglichen Ausbreitungsgrad, zu dem eine gespreitete Zelle fähig ist, noch nicht erreicht. Es ist denkbar, daß im Lichtmikroskop auch bei Verwendung des Interferenzkontrastes kleinere Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit nicht erkannt werden. Dadurch wird beim "hohen" Monozyten möglicherweise auch über nicht gekrümmten Anteilen der Zelloberfläche wegen der Bestimmung durch die Projektionsfläche eine Plasmamembranfläche angenommen, die kleiner als die tätsächlich vorliegende Fläche ist. Insgesamt kann aus dem vorliegenden Datenmaterial allerdings geschlossen werden, daß keine Monozytensubpopulationen mit unterschiedlichen Rezeptorkonzentrationen vorliegen.

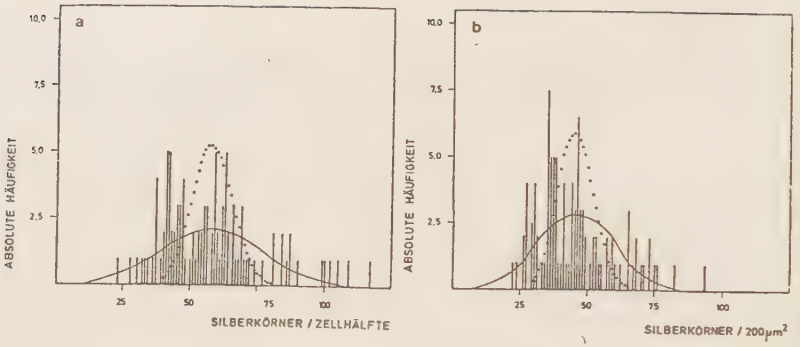
TABELLE IV.9.

DIE ANZAHL SILBERKÖRNER AUF DER ZELLHÄLFTE UND DIE AUF EINE KONSTANTE PROJEKTIONSFLÄCHE NORMIERTEN SILBERKORNDICHTEN "FLACHER" UND "HOHER" MONOZYTEN

		autoradiographisches Signal der Totalbindung			
		bez. auf die Zellhälfte		norm.auf eine konst. Fläche	
Inkub. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	"flache" MZ SK/ZH	"hohe" MZ SK/ZH	"flache" MZ SK/200 μm^2 Projekt.fl.	"hohe MZ" SK/200 μm^2 Projekt.fl.
15	10^{-9}	45,6 ± 12,7	42,7 ± 9,7	28,8 ± 8,2	34,0 ± 7,5
25	10^{-8}	58,2, ± 17,6	61,2 ± 20,3	39,5 ± 9,8	50,4 ± 16,1
37	10^{-9}	51,7 ± 17,0	50,1 ± 17,4	28,1 ± 8,5	35,8 ± 11,3

MZ = Monozyten, SK = Silberkörner, ZH = Zellhälfte, Projektfl. = Projektionsfläche.

Bei "flachen" Monozyten deckt sich die Projektionsfläche mit der Plasmamembranfläche (siehe Kapitel IV.3, Seite 86). Beim "hohen" Monozyten könnte es, da die Projektionsfläche auch hier als direktes Maß für die Plasmamembranfläche verwendet wird, zu einer leichten Unterschätzung der Plasmamembranfläche kommen.

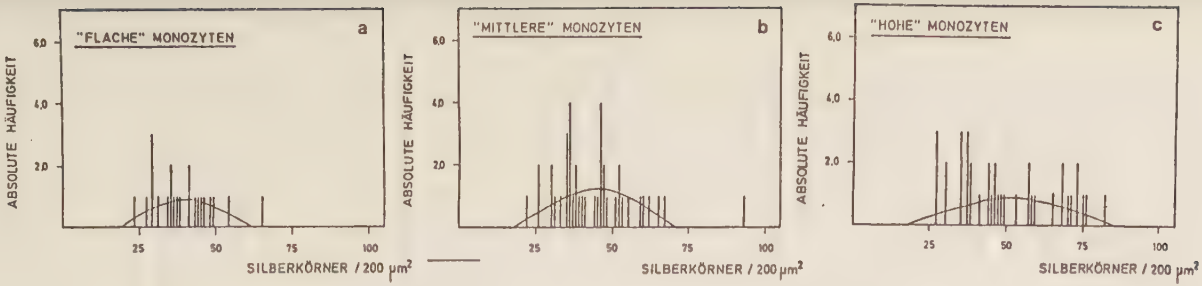


	Silberkörner/Zellhälfte	Silberkörner/200 μm^2
n SK/ZH $\pm$ s	100 58,2 $\pm$ 18,3	100 45,6 $\pm$ 14,2
χ^2-Wert Poissonver.	$\hat{\chi}^2$=180,8 > $\chi^2_{17:0,05}$=27,6	$\hat{\chi}^2$=124,0 > $\chi^2_{16:0,05}$=26,3
χ^2-Wert Gauss.Norm.	$\hat{\chi}^2$= 24,8 < $\chi^2_{17:0,05}$=27,6	$\hat{\chi}^2$= 49,5 > $\chi^2_{16:0,05}$=26,3

ABB.IV.18.

DARSTELLUNG DER SILBERKORNVERTEILUNGEN INNERHALB DER MONOZYTENPOPULATION

Die Abbildungen IV.18.a und b geben Silberkornverteilungen in einer Monozytenpopulation wieder, die bei 25°C 1h bei 10^{-8} mol MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin/l inkubiert wurde; die Autoradiogramme wurden 60 Tage exponiert. In der Abbildung IV.18.a wird die auf der Zellhälfte bestimmte Silberkornanzahl in der gesamten Monozytenpopulation wiedergegeben, in der Abbildung IV.18.b wird die Silberkornverteilung derselben Zellen auf eine konstante Fläche von 200 μm^2 normiert. Die aus dem jeweiligen Mittelwert gebildete Poissonverteilung (●) und die aus Mittelwert und Standardabweichung berechnete Gaussche Normalverteilung (—) werden mitangegeben. Beide Verteilungen sind nicht durch eine Poisson-Verteilung zu beschreiben.Die Silberkornverteilung auf der Zellhälfte zeigt eine Anpassung an eine Gaussche Normalverteilung, während die auf 200 μm^2 normierte Silberkorndichteverteilung auch durch eine Normalverteilung nicht beschrieben wurde.



	"flache" Monozyten	"mittlere" Monozyten	"hohe" Monozyten
n	22	41	37
SK/ZH ± s	39,5 ± 9,8	44,5 ± 13,2	50,4 ± 16,1
χ^2-Wert Gauss.Norm.	$\hat{\chi}^2=1,3<\chi^2_{2:0,05}=6,0$	$\hat{\chi}^2=6,8<\chi^2_{6:0,05}=12,6$	$\hat{\chi}^2=6,4<\chi^2_{5:0,05}=11,1$

ABB.IV.19.a-c

DARSTELLUNG DER NORMIERTEN SILBERKORNDICHTEVERTEILUNG INNERHALB DER DREI MONOZYTENGRUPPE

In den Abbildungen IV.19.a-c werden die normierten Silberkorndichten auf "flachen", mittleren" und "hohen" Monozyten gegenübergestellt. Es wurde dasselbe Experiment verwendet, für das in der Abbildung IV.18.b die Silberkorndichteverteilung in der gesamten Population gezeigt wurde. Alle drei Monozytengruppen weisen normierte Silberkorndichteverteilungen auf, die sich mit einer Gausschen Normalverteilung beschreiben lassen.

IV.4.3. DIE ABSCHÄTZUNG DER INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEXE AUF DER ZELLOBERFLÄCHE GESPREITETER MONOZYTEN

Sofern zuverlässige Aussagen über die Verteilung von Insulinbindungsstellen auf der Zelloberfläche einer gegebenen Zelle getroffen werden sollen, muß sichergestellt sein, daß das autoradiographische Signal zum überwiegenden Teil auf 125I-Zerfälle in der Plasmamembran zurückzuführen ist.
Um den zelloberflächenassoziierten Anteil an 125I-Insulin quantitativ angeben zu können, muß das Ausmaß der Signalkomponenten, die den lokalisierbaren Anteil stören, bekannt sein.
Bei den vorgestellten Autoradiogrammen wird der nicht lokalisierbare Anteil des Gesamtsignals, zum einen durch den Emulsionshintergrund und zum anderen durch die Emission hochenergetischer Elektronen verursacht wurde.
Da für alle Autoradiogramme nur Photoemulsionschargen verwendet wurden, die einen geringen Emulsionshintergrund aufwiesen, lag dieser, in zellfreien Gebieten bestimmte Anteil am Gesamtsignal zwischen 0,2 und 1,0 Silberkörnern pro 100 μm^2. Bezogen auf die Totalbindung umfaßte er im Mittel 5% der auf einem Monozyten bestimmten Anzahl an Silberkörnern.
Auch Silberkörner, die auf die Emission hochenergetischer Elektronen zurückzuführen sind, können topographisch nicht zugeordnet werden; das Signal, das diese Elektronen verursachen, könnte so auch von internalisiertem Insulin verursacht werden. Die Überprüfung dieses Signalanteils (vergl. Kapitel III.3.5., Seite 41) ließ keine signifikante Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen erkennen. Silberkörner, die durch die Emission hochenergetischer Elektronen verursacht wurden, umfaßten sowohl bei gespreiteten als auch bei kugelförmigen Monozyten zwischen 10 und 16% des Gesamtsignals (vergl. Tabelle IV.10. und Abb.IV.20.), sodaß etwa jedes 7-10 Silberkorn keine Ortsinformation lieferte.
Wenn der Emulsionhintergrund und das durch hochenergetische Elektronen verursachte Signal von der Anzahl Silberkörner auf der Monozytenzellhälfte in Ansatz der Totalbindung subtrahiert

wird, so repräsentiert das verbleibende Signal den Teil an Silberkörnern, der auf niederenergetische Elektronen zurückzuführen war, und deshalb mit Sicherheit durch 125I-Zerfälle auf der Zelloberfläche induziert wurde.
Unter Verwendung der von SEMMLER und JUNGER (1986) an Zellausstrichpräparaten bestimmten Empfindlichkeit der Photoemulsion für niederenergetische Elektronen und der Expositionszeit konnte die Anzahl der auf der Zelloberfläche lokalisierten Insulinmoleküle mit den Formeln (2) und (3) berechnet werden (siehe Kapitel IV.3.5., Seite 41).
Im niedrigeren Insulinkonzentrationsbereich (10^{-9} mol/l) fanden sich zwischen 400 (bei 15°C) und 200 (bei 37°C) 125I-Insulinmoleküle auf der Zelloberfläche gespreiteter Monozyten; bei einer unphysiologisch hohen Insulinkonzentration von 10^{-8} mol/l lagen zwischen 500 (bei 15°C) und 300 (bei 37°C) 125I-Insulinmoleküle auf der Zelloberfläche vor (vergl. Tabelle IV.11.)
Während bei den niedrigeren Insulinkonzentrationen ($\leq 10^{-9}$ mol /l) die unspezifische Bindung vernachlässigbar klein ist, sollte bei der hohen Insulinkonzentration von 10^{-8} mol/l berücksichtigt werden, daß bei 15 und 25°C etwa 10 und bei 37°C sogar 20% des Signals der Totalbindung auf unspezifisch gebundenes Insulin zurückzuführen ist. Ob ein Teil dieser bei der hohen Insulinkonzentration im Ansatz der unspezifischen Bindung gefundenen Silberkörner auf internalisiertes Insulin zurückzuführen war, entzog sich der Bestimmung.

Der Anteil der auf der Zelloberfläche vorliegenden 125I-Insulinmoleküle, der mittels Autoradiographie bestimmt wurde, ließ sich mit dem Anteil an insgesamt pro Monozyt gebundenem Insulin korrelieren, der aus der um den Lymphozytenanteil korrigierten Radioaktivitätsmessung im γ-counter berechnet wurde (vergl. Tabelle IV.11.).
Unabhängig von der Art des verwendeten Tracers war etwa die Hälfte (46% $\pm$ 11) des mit der Radioaktivitätsmessung bestimmten 125I-Insulins auf der Zelloberfläche der gespreiteten

Monozyten lokalisiert.
Die Diskrepanz zwischen der Bestimmung der gebundenen Insulinmoleküle mittels γ-counter und der mittels Autoradiographie auf der Zelloberfläche lokalisierten Insulinmoleküle, führte zu der Vermutung, daß ein Teil des 125I-Insulins von den Monozyten internalisiert wurde.

TABELLE IV.10.

DER AUF DAS SIGNAL DER TOTALBINDUNG BEZOGENE ANTEIL AN SILBERKÖRNERN, DER VON HOCHENERGETISCHEN ELEKTRONEN VERURSACHT WIRD

Inkub. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	n	Anteil an durch Emission hochenergetischer Elektronen verursachten Silberkörnern (% Anteil vom Signal der Totalbindung)
15	10^{-9}	4	10,4 ± 3,4
15	10^{-8}	4	16,4 ± 4,1
25	10^{-9}	3	11,6 ± 3,9
25	10^{-8}	3	15,5 ± 2,7
37	10^{-9}	5	15,0 ± 1,7
37	10^{-8}	1	16,2

n = Anzahl autoradiographischer Bestimmungen.

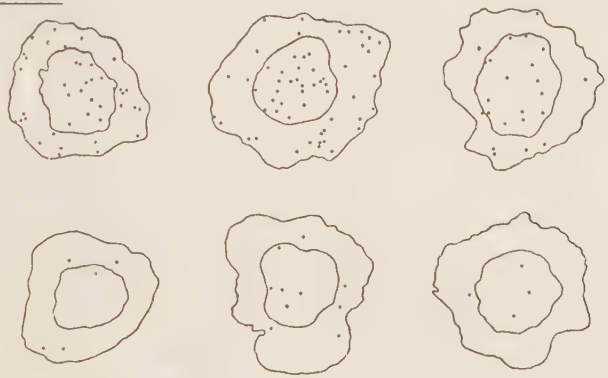
Alle dargestellten Experimente wurden mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin durchgeführt. Die angebenen Werte beruhen auf mittleren Silberkorndichten von Autoradiogrammen der Totalbindung mit einer 20 nm und einem 500 nm dicken Kollodiumschicht zwischen Zelloberfläche und Photoemulsion. Die Silberkorndichten waren jeweils um den Emulsionshintergrund korrigiert. In die Tabelle sind nur Ergebnisse von gespreiteten Monozyten eingegangen.

ABB.IV.2C.

BEISPIELE FÜR DAS AUTORADIOGRAPHISCHE SIGNAL DER TOTALBINDUNG UND DEN ANTEIL DES SIGNALS, DER DURCH HOCHENERGETISCHE ELEKTRONEN VERURSACHT WIRD

TOTALBINDUNG

DURCH HOCHENERG. ELEKTRONEN VERURSACHTES SIGNAL



Inkubationsbedingungen:	15°C/2h/10^{-8}mol/l	25°C/1h/10^{-8}mol/l	37°C/1h/10^{-9}mol/l
TB: SK/ZH ± s*	36,0 ± 11,7	58,2 ± 18,3	18,8 ± 7,6
HE: SK/ZH ± s*	4,2 ± 2,5	10,8 ± 6,8	3,2 ± 2,4
(%)	(11,7%)	(18,6%)	(17,0%)
EH: SK/ZH ± s	1,5 ± 2,1	1,6 ± 2,6	1,2 ± 2,0
(%)	(4,1%)	(2,7%)	(6,3%)

TB = Totalbindung, HE = Anteil Silberkörner, die durch Emission hochenergetischer Elektronen verursacht wurden, EH = Emulsionshintergrund, SK = Silberkörner, ZH = Zellhälfte. * Die angegebenen Silberkorndichten wurden jeweils um den Emulsionshintergrund korrigiert. Autoradiogramme gespreiteter Monozyten von Zellausstrichpräparaten der Totalbindung mit 20 bzw. 500 nm dicken Kollodiumzwischenschichten werden gegenübergestellt. Die über 200 Monozyten gemittelten autoradiographischen Meßdaten werden zu jedem Beispiel ebenfalls angegeben. Superpositionen von 2-3 Fokusebenen wurden als Darstellungsform gewählt, um eine Übersicht über die pro Zellhälfte vorliegen-

TABELLE IV.11.

ZELLOBERFLÄCHENGEBUNDENE INSULINMOLEKÜLE IM VERGLEICH ZU GESAMTGEBUNDENEN INSULINMOLEKÜLEN BEI GESPREITETEN MONOZYTEN

Inkub. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	n	Insulinmoleküle, gesamt (Radioakt.messung mit AR korrigiert)	Insulinmoleküle auf der Zelloberfläche (Autoradiogr. Bestimmung)	zelloberflächen-gebundener Anteil (%)
15	10^{-9}	4	748 ± 218	386 ± 156	50 ± 10
15	10^{-8}	4	1098 ± 227	490 ± 84	46 ± 7
25	10^{-9}	3	696 ± 155	287 ± 43	43 ± 15
25	10^{-8}	3	1083 ± 68	448 ± 37	45 ± 6
37	10^{-9}	5	526 ± 250	219 ± 54	48 ± 19
37	10^{-8}	1	601	319	53

AR = Autoradiographie, n = Anzahl autoradiographischer Bestimmungen; bei jeder dieser Bestimmungen wurde die Silberkorndichte der Totalbindung über mindestens 100, in einigen Fällen über 200 Monozyten gemittelt. Die Tabelle IV.11. ist die Fortsetzung von Tabelle IV.8.. Bei allen in der Tabelle IV.11. aufgeführten Experimenten wurde MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin als Tracer verwendet.

IV.4.4. ABSCHÄTZUNG DES INTERNALISIERTEN ANTEILS AN 125I-INSULIN

Von den verschiedenen endozytotischen Vorgängen wurde für den Monozyten, dem Vorläufer der Makrophagen, vor allem die Phagozytose beschrieben (ACKERMANN und DOUGLAS 1980); beim Makrophagen wurde aber auch fluide und rezeptormediierte Pinozytose (Endozytose) nachgewiesen (STEINMANN et al. 1983).
Das Ausmaß der Endozytose ist zumindest bei dem, dem menschlichen Monozyten ähnlichen Maus-Makrophagen, so groß, daß pro Stunde 20-30% des Zellvolumens aufgenommen wird,und innerhalb von 30 min die gesamte Zelloberfläche vor allem als Pinozytosevesikel endozytiert wird (STEINMANN et al. 1976).
Somit ist denkbar, daß der Monozyt während der Inkubation 125I-Insulin durch fluide oder rezeptormediierte Endozytose in das Zellinnere einschleusen kann.
Falls sich mit steigender Inkubationstemperatur oder Insulinkonzentration erhöhte zellinterne Insulinkonzentrationen oder Insulin-Rezeptor-Komplexkonzentrationen ergeben würden, so müßte sich die Tendenz bereits im Zellausstrichpräparat an einem ebenfalls zunehmenden Anteil der Silberkörner, die auf die Emission hochenergetischer Elektronen zurückzuführen sind, erkennen lassen.
Bei den vorgestellten Autoradiogrammen lag der Anteil an Silberkörnern, der durch hochenergetische Elektronen verursacht wurde, bezogen auf die Totalbindung zwischen 10 und 16% (vergl. Kapitel IV.4.3., Seite 109). Der insgesamt niedrige Anteil des durch hochenergetische Elektronen verursachten Signals wies darauf hin, daß ein großer Teil des 125I-Insulins an der Zelloberfläche gebunden vorlag. Außerdem zeigte dieser Anteil am Gesamtsignal keine deutliche Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen.

Die Quantifizierung der plasmamembrangebundenen sowie der internalisierten Insulinanteile ist von einer eindeutigen Identifizierung der Kompartimente und einer quantitativen Zuordnung des Tracers abhängig.
Es gibt verschiedene Möglichkeiten zwischen zelloberflächengebundenem und internalisiertem Tracer zu unterscheiden.
Von einigen Arbeitsgruppen wurde die beschleunigte Dissoziation von plasmamembrangebundenem Insulin in saurem Medium ausgenutzt, um die Anteile an oberflächengebundenem und internalisiertem Liganden zu differenzieren (HAIGLER et al., 1980, CARO et al. 1982, OLEFSKY und KAO 1982, DRAZNIN et al. 1984). Diese Methode setzt voraus, daß die Zellen durch die Behandlung nicht geschädigt werden und eine vollständige Dissoziation des Tracers von der Plasmamembran erfolgt.
Einer der ersten Nachweise der Internalisierung von 125I-Insulin gelang mit autoradiographischen Methoden an IM-9 Lymphozyten und Hepatozyten (zur Übersicht: GORDEN et al. 1980).
So wurde neben der beschleunigten Dissoziation im sauren Medium in der vorliegenden Arbeit die quantitative lichtmikroskopische Autoradiographie von Semidünnschnitten zur Unterscheidung von plasmamembranständigem bzw. internalisiertem Liganden eingesetzt. Diese Methode ermöglicht es, unter Einbeziehung der autoradiographischen Auflösung die "wahrscheinlichste" Verteilung des Tracers innerhalb mehrerer Kompartimente zu bestimmen.
Die mit beiden Methoden erzielten Ergebnisse werden vorgestellt und auf ihre Zuverlässigkeit geprüft.

IV.4.4.1. ABSCHÄTZUNG DES INTERNALISIERTEN ANTEILS AN 125I-INSULIN DURCH ANSÄUERN DES UMGEBENDEN MILIEUS

Von HAIGLER et al. (1980) wurde eine Methode beschrieben, die die Identifizierung eines internalisierten Anteils an 125I-"epidermal-growth-factor" ermöglichte. Hierbei wurde der zelloberflächenassoziierte Ligand durch eine drastische Senkung des pH-Werts im umgebenden Milieu (pH = 2,5) abgelöst, während der internalisierte und demnach der Säureeinwirkung unzugängliche Anteil des Tracers nicht auswaschbar sein sollte.
Diese Methode wurde bei Hepatozyten auch auf die Bestimmung des internalisierten Anteil an 125I-Insulin angewendet (DRAZNIN et al. 1984, OLEFSKY und KAO 1982). Die Dissoziation des oberflächengebundenen Insulins erwies sich als extrem pH-abhängig; während sich nach 5-10 min im Bereich zwischen pH 2,0 & 3,0 90% ablösen ließ, dissoziierte bei 4°C in der gleichen Zeitspanne bereits oberhalb von pH 4,0 nur noch ein Bruchteil des plasmamembranständigen Insulins, (CARO et al. 1982).
Da Blutzellen gegenüber pH-Änderungen empfindlich sind, wurde in einem Vorexperiment die Überlebensrate mononukleärer Leukozyten im saurem Medium getestet. Die Zellpopulation wurde zunächst wie bei den Bindungsexperimenten mit nativem Insulin (10^{-9} mol/l) bei 15°C (2h) bzw. bei 37°C (1h) inkubiert. Aliquots der vom nicht gebundenen Insulin befreiten Zellsuspension wurden für 5, 15 und 30 min mit hypertoner Essigsäure-Lösung nach HAIGLER et al. (1980), bzw. mit saurem Hepes^{R}-Puffer bei 4°C versetzt.
Tabelle IV.12. zeigt anhand der Aufnahme von Trypanblau die Zunahme an membrangeschädigten Zellen nach Säureeinwirkung. Bereits nach einer Säureeinwirkung von 5 min ließen sich Monozyten und Lymphozyten im Lichtmikroskop kaum mehr voneinander unterscheiden. Da die Monozyten ihre Fähigkeit, auf einer Glasoberfläche zu spreiten, weitgehend verloren hatten, war eine Quantifizierung geschädigter Monozyten nicht möglich. Vor der Säureeinwirkung erwies sich der größte Teil der Zellpopulation (>90%) als vital. Nach 5 min Säureeinwirkung waren

in beiden Medien etwa 30% der Zellpopulation so stark geschädigt, daß der Farbstoff in die Zellen diffundieren konnte und nach 30 min war bereits die Hälfte der Zellsuspension Trypanblau färbbar.
Die noch vitalen Zellen, die der hypertonen Essigsäure-Lösung ausgesetzt waren, erschienen auch nach längerer Nachinkubation in Hanks-Puffer (pH 7,4, 280 mosmol/kg, 1% BSA) noch stark geschrumpft, deshalb wurde die hypertone Lösung nicht weiter verwendet.

Der nach Säurebehandlung noch zellassoziierte Anteil an 125I-Insulin wurde im Anschluß an eine Inkubation bei 15°C (2h), bzw. 25 und 37°C (1h) bei einer Insulinkonzentration von 10^{-9} mol/l bestimmt.
Um eine allzugroße Zellschädigung zu vermeiden, wurde eine Säureeinwirkungszeit von 5 min nicht überschritten.
Tabelle IV.13. stellt die Menge an zellassoziiertem Insulin in Abhängigkeit von den verschiedenen Inkubationsbedingungen dar.
Die Zellviabilität nahm wie im Vorexperiment von 95% zu Beginn auf 60-70% nach 5 min Säureeinwirkung ab.
Unabhängig von der gewählten Inkubationstemperatur verblieben etwa 60% der ursprünglich gemessenen Radioaktivität nach der Säurebehandlung zellassoziiert. Im Verlauf von 100 min Nachinkubationsdauer bei 4°C in einem isotonen Hanks-Puffer (pH 7,4, 280 mosmol) reduzierte sich dieser Anteil an 125I-Insulin im Mittel auf 25%. Es handelte sich hierbei vermutlich um die Diffusion von 125I-Insulin aus den geschädigten Zellen, da erfahrungsgemäß eine Temperatursenkung auf 4°C in einer vitalen Zellpopulation ausreichte, um die Dissoziation des gebundenen Tracers zu unterbinden.
Im Verlauf von insgesamt 200 min Nachinkubation nahm die Schädigung der Zellpopulation so weit zu, daß mehr als die Hälfte der Zellen Trypanblau aufnahm, während die Viabilität eines nicht säurebehandelten Aliquots immer noch bei 92% lag. Die elektronenmikroskopische Abbildung IV.21. zeigt den Erhal-

tungszustand der Zellorganellen nach 5 min Säureeinwirkung. Bei einem großen Teil der Zellen zeigte sich, daß die Plasmamembran bereits deutlich geschädigt war; bei diesen Zellen ließ sich Rutheniumrot, ein intakte Plasmamembranen aufgrund seiner Größe nicht durchdringendes Molekül, auch im Zellinnern nachweisen. Von einem weiteren Teil der Zellen fanden sich infolge der Säureeinwirkung nur noch Zellbruchstücke. Die morphologischen Befunde weisen darauf hin, daß diese Methode zumindest bei der Wahl der mononukleären Leukozyten zur Differenzierung von plasmamembranständigem und internalisiertem Insulin nicht geeignet ist.

TABELLE IV.12.
VIABILITÄT DER ZELLSUSPENSION NACH SÄUREEINWIRKUNG

Inkub. temp. (°C)	pH-Wert d. Inkubats	Dauer der Säureeinw. (min)	0,2 m Essigsäure nach HAIGLER et al. (1980) (pH3,0, 1080 mosmol/kg)	Hepes^{R}-Puffer (pH3,0, 280 mosmol/kg)
			Zellviabilität	Zellviabilität
15	7,4	0	95%*	91%*
"	3,2	5	72%	65%
"	"	15	64%	52%
"	"	30	50%	46%
37	7,4	0	91%*	91%*
"	3,2	5	75%	71%
"	"	15	66%	69%
"	"	30	52%	53%

$41,4*10^{6}$ mononukleäre Leukozyten (14% Monozyten) wurden mit nativem Insulin ($1*10^{-9}$ mol/l) bei 15°C (2h) bzw. bei 37°C (1h) inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Abtrennung des freien Insulins über einen Percoll^{TM}-Gradienten bei 4°C. Aliquots der nachgereinigten Zellsuspension wurden bei 4°C für 5, 15 und 30 min den beiden sauren Medien ausgesetzt. Das nach der Säureeinwirkung bei 4°C sedimentierte Zellpellet wurde mit isotonem Hanks-Puffer (pH=7,4, 280 mosmol/kg, 1% BSA) aufgenommen und mittels Trypanblautest auf geschädigte Zellen geprüft.

* Diese Angaben beziehen sich auf den Erhaltungszustand der Zellsuspension unmittelbar vor der Säurezugabe, jedoch nach der Inkubation bei der entsprechenden Temperatur.

TABELLE IV.13.

NICHT DISSOZIIERTER ANTEIL AN 125I-INSULIN NACH SÄUREBEHANDLUNG

Inkub. temp. (C)	Totalbindung	nicht dissoziierter Anteil an 125I-Insulin		
		nach 5 min Säure-einwirkung (4°C)	nach 5 min Säureeinw. einschl. Nachinkubation in Hanks-Puffer (pH 7,4) 100 min/4°C	200 min/4°C
15	100% (93% ZV)	64% (69% ZV)	27% (65% ZV)	27% (54% ZV)
25	100% (94% ZV)	67% (59%ZV)	19% (62% ZV)	9% (40% ZV)
37	100% (94% ZV)	63% (63% ZV)	23% (44% ZV)	16% (40% ZV)

$51,0*10^6$ mononukleäre Leukozyten (16% Monozyten) wurden mit 125I-Insulin einer spezifischen Aktivität von 240 µCi/µg und einer Konzentration von 10^{-9} mol/l für 2h bei 15°C bzw. 1h bei 25 und 37°C inkubiert. Nach der Abtrennung des freien Insulins wurden Aliquots der Zellsuspension für 5 min mit saurem Hepes^R-Puffer (pH=3,0, 300 mosmol/kg) versetzt. Die Dissoziation des Tracers durch Säureeinfluß wurde nur an Totalbindungsansätzen überprüft. Die Bindungswerte der Totalbindung nach der Abtrennung des freien Insulins und erfolgter Nachreinigung wurden als Referenz verwendet. Die Angaben in Klammern unter den jeweiligen Bindungswerten geben die Zellviabilität (ZV) an.

Die Senkung der Temperatur auf 4°C erwies sich bei einer vitalen Zellpopulation erfahrungsgemäß als ausreichend um die Dissoziation des Tracers für einem Zeitraum von mehr als 200 min zu unterbinden.

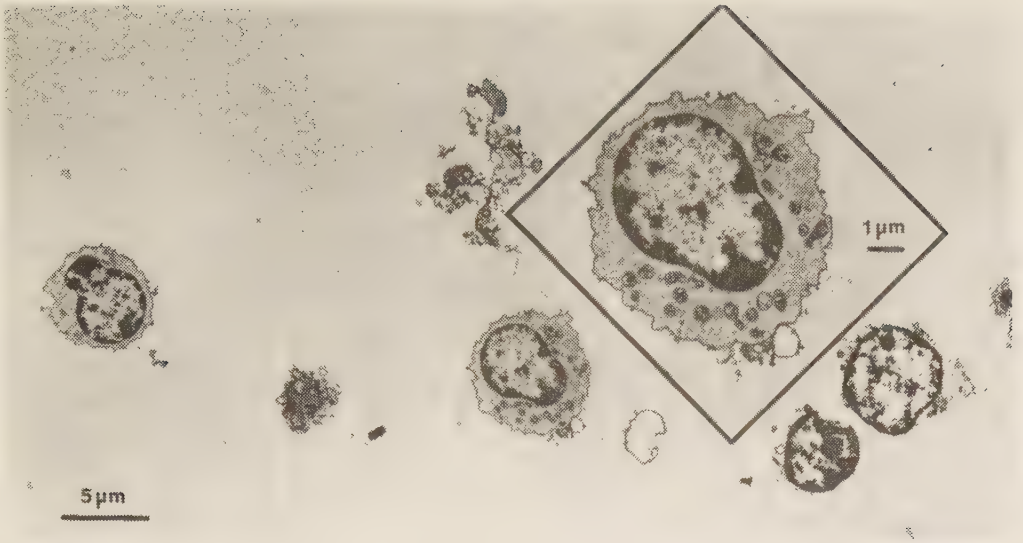


Abb.IV.21.
ERHALTUNGZUSTAND SÄUREBEHANDELTER MONONUKLEÄRER LEUKOZYTEN IM ELEKTRONENMIKROSKOP

Der elektronenmikroskopische Querschnitt gibt einen Überblick über den Erhaltungszustand mononukleärer Leukozyten, die nach einer Inkubation bei 37°C (10^{-9} mol 125I-Insulin/l) und Abtrennung des nicht gebundenen Insulins im Percoll^{TM}-Gradienten für 5 min bei 4°C saurem Hepes^{R}-Puffer (pH 3,0, 300 mosmol/kg) ausgesetzt waren. Ein großer Teil der Zellsuspension wurde durch die Säurebehandlung so weit geschädigt, daß nur noch Zellbruchstücke vorlagen, aber auch die Zellen, bei denen Rutheniumrot noch nicht ins Zellinnere gelangte, weisen einen mit unbehandelten Zellen nicht mehr vergleichbaren Erhaltungszustand auf.

IV.4.4.2. ABSCHÄTZUNG DES INTERNALISIERTEN ANTEILS AN 125I-INSULIN MITTELS AUTORADIOGRAPHIE VON SEMIDÜNNSCHNITTEN

Die Autoradiogramme von Semidünnschnitten kugelförmiger Monozyten erlaubten, den Anteil an internalisiertem Insulin abzuschätzen. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung konnte allerdings nur eine Differenzierung zwischen zellinternem und plasmamembranständigem Tracer vorgenommen werden und keine Zuordnung zu Zellorganellen getroffen werden.

Um die Autoradiogramme von Semidünnschnitten auswerten zu können, wurde zunächst eine "crossfire"-Matrix erstellt, sodaß eine Wichtung der im Autoradiogramm über den jeweiligen Kompartimenten gefundenen Silberkörner möglich war.
Es wurden drei Kompartimente definiert: der Bereich des Einbettungsmittels E, der Bereich der Plasmamembran P und der Bereich des Cytoplasmas I. Der Bereich der Plasmamembran der im Lichtmikroskop ausgewerteten Zellschnitte war bei 5000-facher Vergrößerung nur als Strich zu erkennen, zur Bestimmung der membranständigen Silberkörner wurde er auf eine Dicke von 0,5 µm (2 HD) aufgeweitet.
Zur Erstellung der "crossfire"-Matrix wurde ein Monozytenschnitt mit einer mittleren Fläche von 75 μm^2 und einen Umfang von 40 µm ausgewählt (siehe Tabelle IV.14.).
Insgesamt wurden 1300 Strahlquellen über der gesamten Zählfläche (254 μm^2) verteilt; durch die Zuordnung der hypothetischen Strahlquellen und der möglichen Silberkörner zu den unterliegenden Kompartimenten E, P und I, ließ sich die normierte "crossfire"-Matrix erstellen (Tabelle IV.14). Sie gibt die Wahrscheinlichkeiten an, mit denen bei einem Zellschnitt dieser Größe und derart gefalteter Plasmamembran radioaktive Zerfälle in einem Kompartiment Silberkörner in ihrem eigenen oder einem Nachbar-Kompartiment erzeugen.
An Monozyten mit anderen Verhältnissen von Fläche zu Umfang wurden ebenfalls "crossfire"-Matrizen erstellt. Die geringfügigen Formveränderungen übten jedoch keinen Einfluß auf

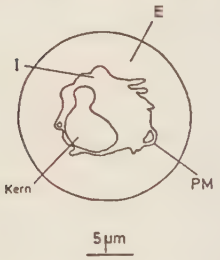
die Wahrscheinlichkeitsverteilung aus, sodaß es zulässig erschien, für alle weiteren Auswertungen an Semidünnschnitten kugelförmiger Monozyten die in Tabelle IV.14. wiedergegebene "crossfire"-Matrix zu verwenden.
Typische Beispiele solcher lichtmikroskopischer Autoradiogramme wurden in Abbildung IV.22. zusammengestellt.

Trotz langer Expositionszeiten (80 bis 150 Tage) war das autoradiographische Signal am Einzelschnitt gering, sodaß die Bestimmung der Insulinkonzentration am Autoradiogramm eines einzelnen Zellschnitts starken Schwankungen unterworfen war und Aussagen über die Verteilung des Tracers in den drei Kompartimenten mit großer Unsicherheit behaftet waren (vergl. Abb.IV. 23.).
Die Summation über alle Zellschnitte lieferte hingegen zuverlässigere Angaben über die Menge an Insulin in jedem der Kompartimente. Bei einem ausgewählten Beispiel wurden die Silberkörner in den drei Kompartimenten über 156 Zellschnitte addiert. Die summierten Silberkörner pro Kompartiment wurden durch die "crossfire"-Matrix (Tabelle IV.14.) gewichtet.
Aus der mittels Digitizer bei allen Zellschnitten durchgeführten Bestimmung des Zellumfangs und der Zellfläche ließen sich durch Einbeziehung der auf 0,5 µm aufgeweiteten Breite der Plasmamembran die mittleren Flächen der drei Kompartimente bestimmen. Unter Einbeziehung dieser Flächenbestimmungen und der Schnittdicke (0,5 $\pm$ 0,02 µm) wurden aus den durch die "crossfire"-Matrix bestimmten Orten der radioaktiven Quellen die progressiven Mittelwerte der 125I-Insulinkonzentration pro Kompartimentvolumen mit den Formeln (2) und (3) (siehe Kapitel III.3.5., Seite 41) berechnet.
Die Abbildung IV.24. stellt den Verlauf der progressiven Mittelwerte der in den drei Kompartimenten bestimmten Insulinkonzentration pro μm^3 für alle Kompartimente dar.
Während die Bestimmung der Insulinkonzentration in dem relativ großen Kompartiment des Cytoplasmas bereits nach der Summierung von etwa 70 Zellschnitten einen annähernd konstan-

ten progressiven Mittelwert erreichte, mußten etwa doppelt so viele Schnitte ausgewertet werden, um den Anteil der Insulinmoleküle in der Plasmamembran mit einer ähnlich großen statistischen Wahrscheinlichkeit bestimmen zu können.
Bei allen Auswertungen erfolgte die Bestimmung der Insulinkonzentration pro Kompartimentvolumen durch Summation aller beobachteten Silberkörner, die bei 150-400 Schnitten in den jeweiligen Kompartimenten gefunden wurden.
Bei allen Autoradiogrammen erwies sich die Konzentration der ^{125}I-Insulinmoleküle in der Plasmamembran als 2-6-mal größer als im Cytoplasma.

TABELLE IV.14.

BEISPIEL EINER AUSWERTUNG NACH D O W N S UND W I L L I A M S (1978)



Schematische Darstellung des Monozytenschnitts, an dem die "crossfire"-Matrix erstellt wurde.
(E = Einbettungsmittel, P = Plasmamembran, I = Cytoplasma)

"CROSSFIRE"-MATRIX

HYPOTHETISCHE SILBERKÖRNER

HYPOTHETISCHE STRAHLQUELLEN	E	P	I	
E	0,922	0,036	0,042	= 1
P	0,287	0,478	0,235	= 1
I	0,098	0,081	0,821	= 1
beobachtete Silberkörner :	526	408	675	= 1609
Strahlquellen :	279	731	599	= 1609
relative Anteile :	0,17	0,45	0,37	
Fläche (μm^2) :	53580	4845	14820	
Schnittdicke (µm) :		0,5 ± 0,021		
INSULINMOLEKÜLE/μm^3 :	0,08	2,37	0,63	

Expositionszeit der Autoradiogramme : 60 Tage
Inkubationsbedingungen : 25°C/ 1h/ 10^{-8} mol Insulin/l
spezifische Radioaktivität : 4085 dpm/10^{-15} Mol

Bei einem geschätzten Gesamtvolumen des Cytoplasmas (284 μm^3) bzw. der Plasmamembran (184 μm^3) (siehe Seite 129) finden sich insgesamt 436 Insulinmoleküle in der Plasmamembran und 179 im Cytoplasma, der internalisierte Anteil beträgt demnach 29%.

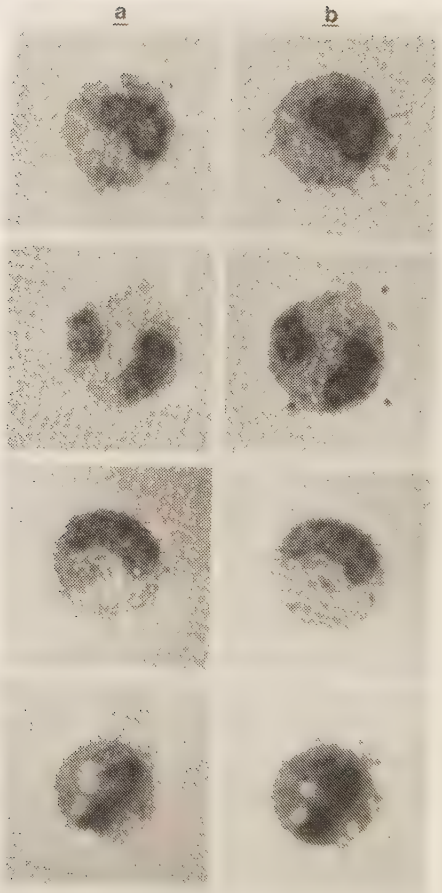


ABB.IV.22.

AUTORADIOGRAMME VON SEMIDÜNNSCHNITTEN MONONUKLEÄRER LEUKOZYTEN

Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte im Lichtmikroskop unter Verwendung von Mischlicht (einer Kombination aus Auflicht-Hellfeld-beleuchtung und Durchlicht).

Die Silberkörner erscheinen hell, da sie bei geschlossener Kondensorblende bei Auflicht-Hellfeldbeleuchtung photographiert wurden. Bei den Aufnahmen in der rechten Spalte treten die Zellkonturen durch die geöffnete Kondensorblende deutlicher hervor, sodaß die Zuordnung der Silberkörner zu einem Kompartiment möglich wird.

Kompartiment	Silberkörner	Strahlquellen	Kompartim. Volumen µm3	INSULINMOLEKÜLE/µm3 Einzelschnitt	progr. Mittelw.
E	3	1,86	85	0,13	
P	2	3,61	11	2,00	
I	3	2,52	35	0,43	
E	2	0,05	89	0,00	0,07
P	3	5,72	8	4,25	2,83
I	4	3,23	30	0,63	0,51
E	1	0,69	83	0,05	0,06
P	0	-	11	-	1,61
I	6	7,66	36	1,26	0,79
E	2	0,54	86	0,04	0,05
P	2	3,06	10	1,86	1,67
I	6	6,40	34	1,12	0,88
E	5	4,30	88	0,29	0,10
P	2	4,09	10	2,56	1,65
I	0	-	32	-	0,65

ABB.IV.23.

AUSWERTUNG DER AUTORADIOGRAMME VON SEMIDÜNNSCHNITTEN EINES MONOZYTEN

Die abgebildeten Autoradiogramme von Semidünnschnitten geben die Silberkornverteilung in den drei Kompartimenten E (Einbettungsmedium), P (Plasmamembran) und I (Cytoplasma) am Beispiel eines ausgewählten Monozyten wieder. Die verwendete Zellsuspension ($43,8*10^6$ mononukleäre Leukozyten, 12% Monozyten) wurde bei 25°C mit 125I-Insulin einer spezifischen Aktivität von 280 µCi/µg (3600 dpm/Mol^{-15}) und einer Konzentration von 10^{-8} mol/l 1h inkubiert. Die Expositionszeit der Semidünnschnitt-Autoradiogramme betrug 120 Tage. Die Bestimmung der Insulinkonzentration pro Kompartiment-Volumen unterliegt wegen des geringen Signals starken Schwankungen, die sich bei dieser geringen Anzahl ausgewerteter Zellschnitte auch nicht durch die Bildung progressiver Mittelwerte ausgleichen lassen. Welche Insulinkonzentrationen im vorgestellten Experiment im Mittel vorlagen, zeigt Abbildung IV.24..

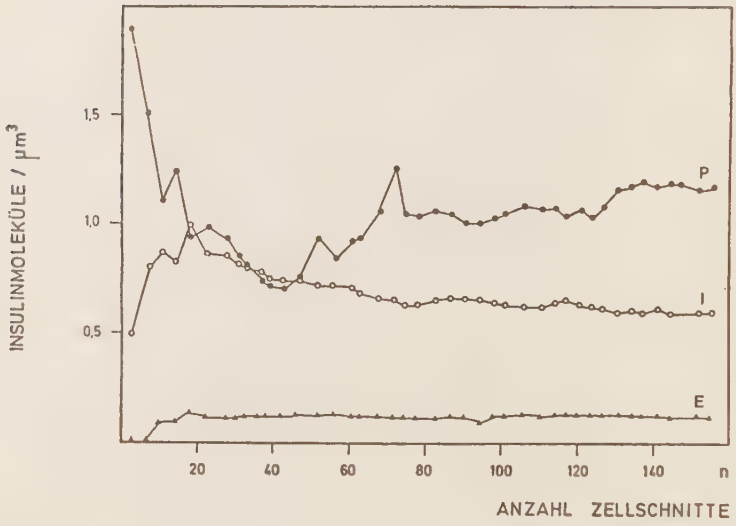


ABB.IV.24.
PROGRESSIVE MITTELWERTE DER INSULINKONZENTRATION PRO KOMPARTIMENT

Die durch sukzessives Summieren von 156 Zellschnitten entwickelten progressiven Mittelwerte der Insulinkonzentration pro Kompartimentvolumen wurden für das in Abbildung IV.23. aufgeführte Experiment dargestellt. Beim vorliegenden Experiment wurden die Insulinkonzentrationen pro Kompartiment-Volumen bestimmt, indem über 156 Zellschnitte gemittelt wurde. In der Plasmamembran (P) fanden sich im Mittel 0,60, im Cytoplasma (I) 1,19 und im Einbettungsmedium (E) 0,13 Insulinmoleküle/μm^3.
Bei einem Cytoplasmavolumen der gesamten kugelförmigen Zelle von etwa 400 μm^3 und einem Plasmamembranvolumen von 255 μm^3 befinden sich im Mittel 300 Insulinmoleküle in der Plasmamembran, während 240 Insulinmoleküle im Cytoplasma vorliegen, sodaß in diesem Fall im Mittel 44% des Liganden internalisiert wurden.

Das eigentliche Ziel dieser Auswertungen war die Abgrenzung des internalisierten Anteils an 125I-Insulin vom zelloberflächengebundenen Anteil.
Die Verteilung des Tracers zwischen Zelloberfläche und Cytoplasma ließ sich aus der Konzentrationsbestimmung im Schnittpräparat allein noch nicht ableiten, da beide Kompartimente unterschiedlich große Volumenanteile der Gesamtzelle umfassen. Unter Annahme einer Kugelgeometrie wurden die Cytoplasma- bzw. Plasmamembranvolumen einer Durchschnittszelle berechnet. Erst durch die Einbeziehung dieser mittleren Volumen konnten aus den Insulinkonzentrationen/μm^2 die Insulinmengen pro Gesamtvolumen Cytoplasma bzw. Plasmamembran berechnet werden. Die Verteilung des Tracers zwischen diesen beiden Kompartimenten ließ sich anhand der relativen Anteile abschätzen (vergl. Tabelle IV.15.).
Bei allen Inkubationsbedingungen war der Anteil an zelloberflächengebundenem 125I-Insulin deutlich höher im Vergleich zum Anteil an internalisiertem Tracer. Bei der niedrigeren Insulinkonzentration von 10^{-9} mol/l war über den Temperaturbereich kein Anstieg in der Menge des internalisierten Liganden zu erkennen, allerdings lag bereits bei einer Inkubation von 15°C etwa 1/5 des zellassoziierten 125I-Insulins nicht mehr auf der Zelloberfläche vor. Unabhängig von der Inkubationstemperatur verursachte eine unphysiologisch hohe Tracerkonzentration (10^{-8} mol/l) eine Zunahme des internalisierten Anteils auf mehr als 30% des insgesamt gebundenen Liganden. Die durch den niedrigen Anteil der durch hochenergetische Elektronen verursachten Silberkörner gestützte Annahme, daß ein nur geringer Teil an 125I-Insulin von den Monozyten eingeschleust wurde, ließ sich mit der autoradiographischen Abschätzung des internalisierten Anteils an 125I-Insulin im Semidünnschnitt bestätigen.
Da die zur Berechnung verwendeten Volumenbestimmungen nur groben Näherungen des Plasmamembran- und des Cytoplasmavolumens entsprechen, war es auch mit dieser Methode nur möglich, die Menge des internalisierten Liganden vorsichtig abzuschätzen.

TABELLE IV.15.

DER INTERNALISIERTE ANTEIL AN 125I-INSULIN IN ABHÄNGIGKEIT VON DEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN BESTIMMT ANHAND DER AUTORADIOGRAMME VON SEMIDÜNNSCHNITTEN

Inkub. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	n	Prozentualer Anteil an 125I-Insulinmolekülen in der Plasmamembran (P) bzw. im Cytoplasma (I) mononukleärer Leukozyten	
			P	I
15	$5*10^{-10}$	1	75%	20%
25	10^{-8}	2	63% ± 11%	37% ± 11%
37	10^{-9}	3	78% ± 7%	22% ± 7%
37	10^{-8}	1	70	30

n = Anzahl ausgewerteter Autoradiogramme

IV.5. ANALYSE DER INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEX VERTEILUNG AUF DER ZELLOBERFLÄCHE VON MONOZYTEN

IV.5.1. INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEX VERTEILUNG AUF KUGELFÖRMIGEN MONOZYTEN

Neben den Autoradiogrammen von Zellausstrichpräparaten gespreiteter Monozyten wurden bei allen Inkubationsbedingungen zusätzlich Autoradiogramme von Zellausstrichpräparaten kugelförmiger Monozyten erstellt, sodaß es prinzipiell möglich war, auch bei diesen Zellen Aussagen über die Verteilung der Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Zelloberfläche zu treffen. Allerdings erschweren das stark gefaltete Oberflächenrelief, das die autoradiographische Zählausbeute vermindert, und der durch die Höhe der kugelförmigen Zellen auftretende Projektionseffekt (vergl. Kapitel IV.3., Seite 77), die zuverlässige Lokalisation der Silberkörner bzw. Insulinbindungsstellen. Autoradiogramme, bei denen mehr als 30-40 Silberkörner pro Zellhälfte vorlagen, konnten nicht ausgewertet werden, da sich auf der kleinen Auswertungsfläche - die Oberfläche der Zellhälfte betrug 50-70 μm^2 - die einzelnen Silberkörnern nicht mehr unterscheiden ließen. Außerdem war die Auswertungsfläche unter den gewählten Abbildungsbedingungen zu klein, als daß sich analytische Verfahren wie die Bestimmung der "Nächsten Nachbarn" (Kapitel III.5.1., Seite 48) oder die Quadratmethode (Kapitel III.5.2, Seite 52), die die Verteilung quantitativ charakterisieren könnten, einsetzen ließen.
Die durch Fixierung in Suspension erhaltenen kugelförmigen Monozyten kommen aber verglichen mit den gespreiteten Monozyten der natürlichen Gestalt des Monozyten näher. Daher sollte das Verteilungsmuster der Insulinbindungsstellen auch auf diesen Zellen zumindest qualitativ beschrieben werden. Übereinstimmende Aussagen von qualitativ beurteilten Verteilungsmustern bei kugelförmigen und von quantitativ beurteilten Verteilungsmustern bei gespreiteten Monozyten könnten als Hinweis gewertet werden, daß der Spreitungsvorgang die Insulin-Rezep-

tor-Komplex Verteilung nicht beeinflußt.
Auch beim kugelförmigen Monozyten wäre es möglich, die von SCHLESSINGER (1980) beschriebenen auffälligen Signalverteilungen wie "cap"- oder "patch"-Bildungen trotz verminderter Zählausbeute und Projektionseffekte zu erfassen. Pro Experiment wurden die jeweils 100 Silberkornverteilungen, die auf der Zellhälfte kugelförmiger Monozyten in den Präparaten der Totalbindung erstellt wurden, hinsichtlich solcher deutlich sichtbarer Phänomene überprüft (vergl. Abb.IV.25).
Bei den gewählten Inkubationsbedingungen war es weder beim Einsatz von RANDOM-markiertem noch von MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin möglich, Anhäufungen von Silberkörnern bzw. Insulinbindungsstellen in Form von Makroaggregaten ("caps" oder "patches") zu finden.

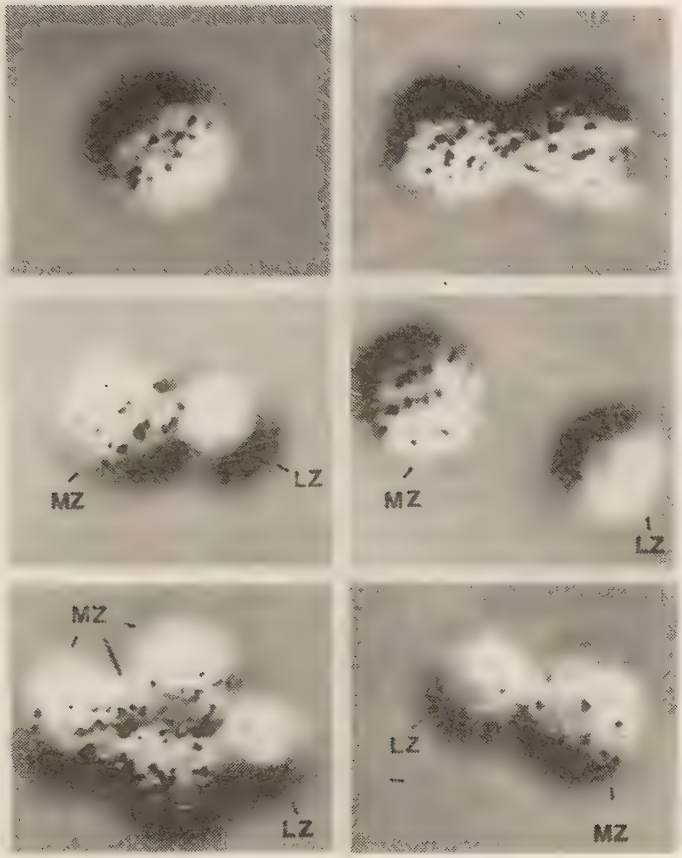


ABB.IV.25.

DIE SILBERKORN- BZW. INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEX VERTEILUNG AUF DER ZELLOBERFLÄCHE KUGELFÖRMIGER MONOZYTEN

Die Verteilung der Silberkörner bzw. Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der oberen Zellkuppe kugelförmiger Monozyten (MZ) zeigt keine Makroaggregate in Form von "patches" oder "caps", sondern erscheint eher zufällig. Die etwas kleineren Lymphozyten (LZ) weisen nur wenige Silberkörner auf. Die dargestellten Zellen wurden bei 15°C und einer Konzentration von 10^{-8} mol MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin/l (spez.Akt.=4230 dpm/mol^{-15}) 2h inkubiert wurden. Die Expositionszeit betrug 11 Tage, die mittlere Anzahl an Silberkörnern pro Zellhälfte lag bei 12,0 $\pm$ 4,8, der durch hochenergetische Elektronen verursachte Signalanteil betrug 17,7%.

IV.5.2. INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEX VERTEILUNG AUF GESPREITETEN MONOZYTEN

IV.5.2.1. DIE EIGNUNG DES GESPREITETEN MONOZYTEN ZUR VERTEILUNGSANALYSE

Der gespreitete Monozyt stellte im Vergleich zur kugelförmigen Zelle das günstigere Objekt zur Verteilungsanalyse dar.
Die große, auswertbare Projektionsfläche ($\sim$250 μm^2) ermöglichte es, die Expositionszeit so zu verlängern, daß eine hohe Anzahl an Zerfällen registriert werden konnte, ohne die Auflösung zwischen einzelnen Silberkörnern (bis zu 80 Silberkörner/Zellhälfte) einzuschränken. Allerdings wurde die Menge an Silberkörnern neben der spezifischen Radioaktivität des Tracers durch die Anzahl der gebundenen Insulinmoleküle limitiert.
Der nur noch geringe Anstieg des Signals oberhalb von Expositionszeiten über 1,5 Halbwertszeiten rechtfertigte eine weitere Verlängerung der Expositionszeit nicht.
Da die Plasmamembran des gespreiteten Monozyten keine Falten oder Furchen aufweist, sollte die Silberkornverteilung ein annäherndes Abbild der auf der Zelloberfläche vorliegenden Verteilung der Insulinbindungstellen wiedergeben.
Trotz der Vorteile, die die gespreiteten Zellen prinzipiell gegenüber den kugelförmigen Monozyten aufweisen, sollte bei einer quantitativen Analyse der Verteilungsmuster der Einfluß der unterschiedlichen Gestalt "flacher" und "hoher" Monozyten (vergl. Abb.IV.26.) berücksichtigt werden.
Zum einen tritt bei "hohen" Monozyten eine Unterschätzung der Plasmamembranfläche durch die bei diesen Zellen deutliche Erhebung über dem Zellkern auf (vergl. Kapitel IV.3., Seite 86).
Zum anderen wurde vermutet, daß die Projektionsfläche der Plasmamembranfläche bei "hohen" Monozyten nicht entspricht,da der "hohe" Monozyt noch nicht vollständig gespreitet ist (vergl. Kapitel IV.4.2., Seite 106).
Anhand der im Interferenzkontrast photographierten Autoradiogramme konnten bei allen gespreiteten Monozyten zwei morpholo-

gisch unterschiedliche Domänen, der Kernbereich und der Plasmasaum, unterschieden werden. Eine Analyse der in diesen beiden Domänen gesondert erfaßten Silberkorndichten könnte Rückschlüsse darüber ermöglichen, ob "flache" und "hohe" Monozyten unterschiedliche Spreitungsstadien darstellen.
Zu diesem Zweck wurde neben der Bestimmung der Silberkorndichte auf dem Plasmasaum die Silberkorndichte bei "flachen" Monozyten über der gesamten Kernregion erfaßt. Bei "mittleren" und "hohen" Monozyten wurden nur Silberkörner des nicht gekrümmten Kernplateaus berücksichtigt. Der Übergang zwischen Kernplateau und Plasmasaum wurde wegen einer möglichen Unterschätzung der Plasmamembranfläche und einer daraus resultierenden Unsicherheit in der Normierung der Silberkörner auf eine konstante Fläche bei dieser Auswertung vernachlässigt.

Die Normierung der Silberkorndichten auf eine konstante Fläche (50 μm^2) ließ erkennen, daß auf dem Kernareal und dem Plasmasaum "flacher" Monozyten annähernd gleiche Silberkorndichten vorlagen. Bei "hohen" Monozyten hingegen ließ sich ein deutlicher Unterschied in der normierten Silberkorndichte beider Areale feststellen. Der Kernbereich "hoher" Monozyten wies in einem Flächenäquivalent einen doppelt so großen Besatz an Silberkörnern und somit an 125I-Insulinmolekülen verglichen mit dem Plasmasaum auf. Bei "mittleren" Monozyten fand sich ein Dichte-Verhältnis von 1 : 0,6.
In der Tabelle IV.26. wurden einige Beispiele für die Silberkorndichten in Kern- und Plasmaregion der drei Monozytengruppen zusammengestellt.
Grundsätzlich war kein Unterschied in der Höhe der normierten Silberkorndichten auf dem Plasmasaum zwischen "hohen" und "flachen" Monozyten eines Experiments zu finden, während die normierten Silberkorndichten innerhalb des Kernareals bei "hohen" Monozyten im Vergleich zu den entsprechenden "flachen" Zellen deutlich größer waren.
Es ist zu bedenken, daß bei jeder Flächennormierung die Projektionsfläche die Bezugsfläche bildet. Die Bestimmungen der Sil-

berkorndichten auf Kernareal und Plasmasaum wurden zwar auch bei "hohen" Monozyten in nicht gekrümmten Bereichen der Oberfläche vorgenommen, aber ob die unterliegende Plasmamembranfläche vollständig glatt ist, läßt sich im Lichtmikroskop auch im Interferenzkontrast nicht feststellen. So wäre es möglich, daß bei den "hohen" Monozyten eine die autoradiographische Zählausbeute noch nicht beeinflussende, leicht gewellte Oberfläche vorliegt.

Über das Verhalten der Plasmamembran während des Spreitens ist, obwohl der Spreitungsvorgang häufig beschrieben wurde (RABINOVITCH und DE STEFANO 1973), wenig bekannt. Im allgemeinen wird davon ausgegangen, daß sich lediglich die zahlreichen Zellausläufer der kugelförmigen Monozyten auseinanderfalten, aber keine Vergrößerung der Zelloberfläche durch den Einbau neuer Membrananteile vorliegt (ACKERMANN und DOUGLAS 1980).

So ließ sich der annähernd gleich hohe Besatz des Plasmasaums "flacher" und "hoher" Monozyten dahingehend interpretieren, daß der Monozyt in der kernfreien Region bei allen Monozytengruppen bereits seinen maximalen Spreitungszustand erreicht hat. Die verglichen mit dem "flachen" Monozyt größere Silberkorndichte der "hohen" Monozyten über dem Kernareal ließ vermuten, daß der "hohe" Monozyt ein spätes Übergangsstadium vom kugelförmigen zum gespreiteten Monozyten darstellt, bei dem im Kernbereich die Plasmamembran noch nicht ganz geglättet ist (vergl. Abb.IV.12., Seite 83 und Abb.IV.13., Seite 84).

Grundsätzlich resultiert aus diesen Überlegungen, daß bei "hohen" Monozyten zwar die quantitative Erfassung der Insulinbindungsstellen auf der Zelloberfläche noch möglich ist, ihre exakte Lokalisation aber nicht nur durch Projektionseffekte (vergl. Kapitel IV.3., Seite 90) eingeschränkt ist.

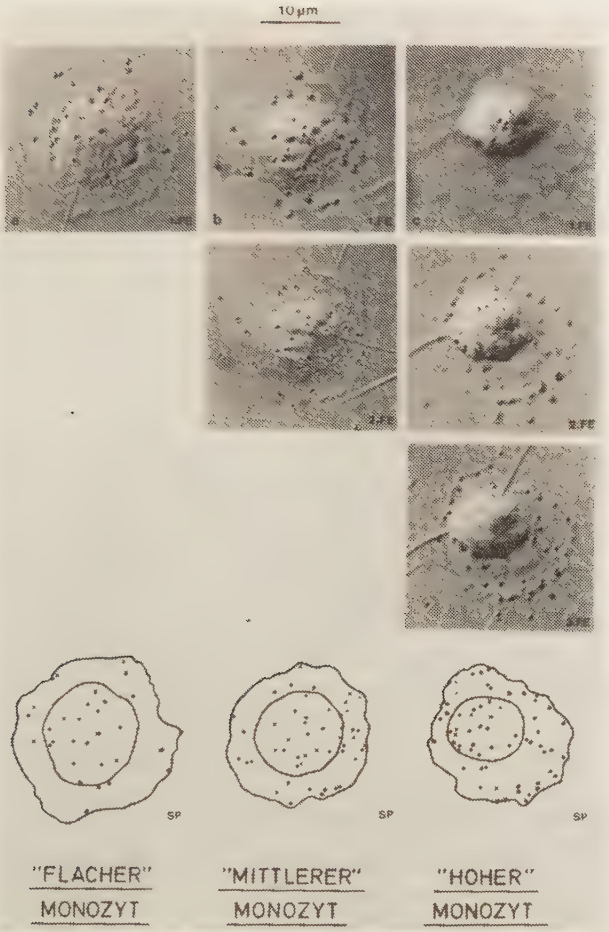


ABB.IV.26.
AUTORADIOGRAPHISCHE AUSWERTUNG BEI "FLACHEN", "MITTLEREN" UND "HOHEN" MONOZYTEN

Während bei den "flachen" Monozyten eine Fokusebene zur vollständigen Erfassung der Silberkörner auf der exponierten Oberfläche ausreichte, war es wegen der deutlichen Erhöhung über dem Kern notwendig, bei den "mittleren" Monozyten eine Superposition von 2 bzw. bei den "hohen" Monozyten von 3 Fokusebenen vorzunehmen, um die Silberkörner vollständig zu erfassen.

TABELLE IV.16.

DIE NORMIERTEN SILBERKORNDICHTEN AUF DEM KERNAREAL UND DEM PLASMASAUM "FLACHER" UND "HOHER" MONOZYTEN

Inkub. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	"FLACHE" MONOZYTEN			"HOHE" MONOZYTEN		
		SK/50 μm^2 Kernareal	SK/50 μm^2 Plasmasaum	Kern:Plasma	SK/50 μm^2 Kernareal	SK/50 μm^2 Plasmasaum	Kern : Plasma
15	10^{-9}	9,0 ± 3,9	6,7 ± 1,4	1 : 0,8	17,3 ± 6,2	6,8 ± 1,9	1 : 0,4
15	10^{-8}	15,5 ± 6,6	10,5 ± 3,0	1 : 0,8	24,1 ± 8,4	11,5 ± 2,7	1 : 0,5
25	10^{-9}	11,4 ± 3,2	6,8 ± 2,4	1 : 0,6	17,8 ± 7,0	8,5 ± 2,8	1 : 0,5
25	10^{-8}	13,2 ± 4,5	8,9 ± 2,8	1 : 0,8	21,3 ± 8,8	10,2 ± 3,2	1 : 0,5
37	10^{-9}	8,5 ± 3,3	6,6 ± 2,1	1 : 0,9	15,8 ± 6,8	7,9 ± 2,9	1 : 0,6
37	10^{-8}	10,2 ± 4,0	7,0 ± 2,9	1 : 0,8	21,7 ± 7,7	7,1 ± 2,0	1 : 0,4

SK = Silberkörner.

Bei den "flachen" Monozyten wurde die gesamten Projektionsflächen von Kernareal und Plasmasaum, die jeweils auch den Plasmamembranflächen entsprachen, in die Auswertung einbezogen (vergl. Kapitel IV.3., Seite 86). Bei "hohen" Monozyten wurde die Bestimmung der Silberkörner auf dem Kernbereich nur auf dem obersten, annähernd ebenen Kernplateau vorgenommen. Der Bereich zwischen Kernplateau und Plasmasaum wurde wegen möglicher Projektionseffekte bei dieser Auswertung nicht berücksichtigt. Der Plasmasaum ging auch bei "hohen" Monozyten vollständig in die Auswertung ein.

Bei allen in Tabelle IV.16. aufgeführten Experimenten wurde MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin als Tracer verwendet.

Vor dem Einsatz der Abstands- oder Quadratmethode zur statistischen Analyse des Verteilungsmusters wurde eine Auswahl unter den zu analysierenden Autoradiogrammen getroffen.
Da die im Autoradiogramm vorgefundenen Silberkörner die Anzahl der innerhalb der Expositionszeit stattfindenden Zerfälle repräsentieren, werden je nach Dauer der Exposition unterschiedliche Anteile der mit 125I-Insulin besetzten Rezeptoren dokumentiert. Innerhalb der verwendeten Expositionszeiten (30-150 Tage) können die im Autoradiogramm vorgefundenen Silberkörner immer nur einen Teil der Insulin-Rezeptor-Komplexe darstellen. Anhand der auf der Zellhälfte vorliegenden Anzahl an Silberkörnern, die auf Zerfälle in der Plasmamembran zurückzuführen waren, und der über die Expositionszeit mit den Formeln (2) und (3) (Kapitel III.3.5., Seite 41) berechneten Zahl an Insulinmolekülen, die von diesen Silberkörnern repräsentiert wurden, ließ sich für alle Autoradiogramme das Verhältnis zwischen Insulin-Rezeptor-Komplexen und den durch die Emission niederenergetischer Elektronen verursachten Silberkörnern abschätzen (vergl. Tabelle IV. 16.).
Zur Verteilungsanalyse wurden nur solche Experimente eingesetzt, bei denen das Verhältnis von Silberkörnern, die durch Zerfälle in der Plasmamembran verursacht wurden, und der daraus berechneten Menge an 125I-Insulinmolekülen besser als 1 : 6 war.
Außerdem wurden die Verteilungsanalysen auf jene Experimente beschränkt, bei denen eine günstige Relation zwischen störenden Komponenten (Signalanteil, der durch hochenergetische Elektronen verursacht wird und Emulsionshintergrund; vergl. Kapitel IV.4.3., Seite 110) und zelloberflächenassoziiertem Signalanteil vorlag.

TABELLE IV.17.

DIE RELATION ZWISCHEN DEM AUTORADIOGRAPHISCHEN SIGNAL UND DEN AUF DER ZELLOBERFLÄCHE LOKALISIERTEN INSULIN-REZEPTOR KOMPLEXEN

Inkub. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	spez. Akt. (dpm/ mol^{-15})	Expos. zeit (d)	SK/ZH ± s+ (TB)	nicht lok. Signal	ZOF-assoz. Anteil des Signals* (ZH)	Insulin moleküle (ZOF)* (ZH)	Verhältnis SK : Insulin-moleküle (ZOF)
15	10^{-9}	3810	50	43,8 ± 12,1	12,6%	38,3	220	1 : 5,7
15	10^{-8}	4130	70	54,3 ± 18,5	21,6%	42,6	230	1 : 5,4
25	10^{-9}	3600	82	41,1 ± 12,9	15,1%	34,9	150	1 : 4,3
25	10^{-8}	4090	60	58,2 ± 18,8	18,6%	47,4	220	1 : 4,6
37	10^{-9}	4090	150	52,3 ± 16,4	12,6%	45,7	130	1 : 2,8
37	10^{-8}	4130	51	36,4 ± 11,0	16,2%	30,5	160	1 : 5,3

SK = Silberkörner, ZH = Zellhälfte, TB = Totalbindung, ZOF = Zelloberfläche, + die angegebenen Werte wurden um den Emulsionshintergrund korrigiert, * das oberflächenassoziierte autoradiographische Signal und die angegebenen Insulinmoleküle beziehen sich jeweils auf die Zellhälfte.

Die oberflächengebundenen Insulinmoleküle wurden aus den lokalisierbaren Signalanteil und den Formeln (2) und (3) (Kap. III.3.5.) und einer Effizienz von 50% berechnet.

Bei den in Tabelle IV.17 aufgeführten Experimente wurden MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin verwendet.

IV.5.2.2. ANALYSE DER INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEX VERTEILUNG AUF GESPREITETEN MONOZYTEN MITTELS ABSTANDSMETHODE

Die zum Studium der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auf der Oberfläche gespreiteter Monozyten eingesetzte, von RIPLEY (1977) etablierte Methode zur Analyse von Objektabständen erlaubt eine Einteilung in zufällige, regelmäßige und segregierte Verteilungen. Durch eine Auswahl von Modellen wurde versucht, die Aussagefähigkeit der Abstandsmethode bei den gewählten experimentellen Bedingungen zu beschreiben.
Die Modelle berücksichtigen einerseits die Hypothesen über das Verhalten von Insulin-Rezeptor-Komplexen in Plasmamembranen, beziehen aber auch die spezielle Morphologie der gespreiteten Monozyten in die Auswertung ein. Die Modelle liefern keine vollständige Beschreibung aller denkbaren Verteilungsmuster, sollen aber die Beurteilung der empirischen Verteilungen, die sich aus den Autoradiogrammen ergeben, erleichtern.

IV.5.2.2.1. DIE VERTEILUNGSMODELLE

Die Verteilungsmodelle wurden auf einem Modellmonozyten (Fläche der Zellhälfte = 360 μm^2, Kernfläche = 120 μm^2) durch zufällige, regelmäßige oder segregierte Punktmuster in der Größenordnung der in den Autoradiogrammen vorliegenden Silberkorndichten erstellt.

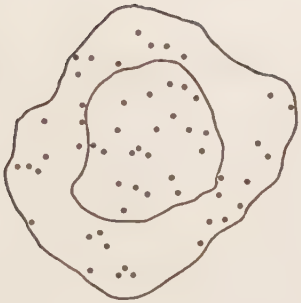
a) Die zufällige Verteilung

Eine zufällige empirische Verteilung zeichnet sich dadurch aus, daß sie einer Poisson-Verteilung entspricht. Im Idealfall muß die kumulative Dichtefunktion der beobachteten Abstände proportional zur Kreisfläche mit dem Radius t sein. Durch die Erfassung der kumulativen Dichtefunktion in der folgenden Form: $\sqrt{\frac{\hat{K}(t)}{\pi}}$

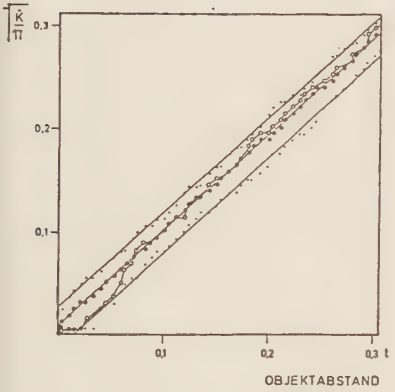
lassen sich die zufälligen Dichteverteilungen und ihre durch Monte Carlo Simulation ermittelten Grenzen als Geraden darstellen. Abweichungen der empirischen kumulativen Dichtefunktion von einer zufälligen Verteilung werden durch den linearisierten Kurvenverlauf präziser erfaßt. Die Beurteilung der empirischen Verteilungen erfolgte anhand der Kurvenverläufe - so wie von RIPLEY (1977) vorgeschlagen - deskriptiv.

Die am Modellmonozyten dargestellten zufälligen Punktmuster (Abb. IV.27.a und b) wurden mittels Zufallsgenerator erzeugt, wobei die Punktdichte von 50 Punkten im mittleren Bereich der für die Verteilungsanalyse ausgewerteten Autoradiogramme lag. Bei beiden Modellen verlief die empirische Abstandsverteilung (○) innerhalb der Grenzen (•), die für eine zufällige Verteilung (●) mittels Monte Carlo Simulation definiert wurden. Die statistischen Tests, die prüfen, ob die gegebene empirische Verteilung einer Poisson-Verteilung entstammt, ergaben ebenfalls eine Anpassung an eine zufällige Verteilung.
Das Supremum s_{emp}, der größte Abstand der empirischen von der theoretischen Funktion, war in beiden Fällen kleiner als der größte Abstand der Simulationen s_{sim} zur theoretischen Funktion.
Auch der Parameter c_{emp}, die Summe aller empirischer Abstände erwies sich kleiner als die Summe der simulierten Abstände. Es traten keine Überschreitungen (q) der empirischen Kurve über die simulierten Grenzen der zufälligen Verteilung auf. Die dargestellten Verteilungen ließen sich demnach als zufällig beschreiben.

a



b



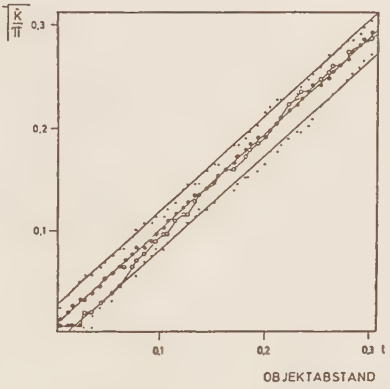


ABB.IV.27.a & b
MODELLE ZUFÄLLIGER VERTEILUNGEN

Auf dem Modellmonozyten wurden 50 Punkte durch einen Zufallsgenerator verteilt. Bei beiden Beispielen verläuft die empirische, kumultive Dichteverteilung (○) innerhalb der Grenzen (•) einer zufälligen Verteilung (●).

Die Ergebnisse der statistischen Tests:

Abb.IV.27.a:
n = 50

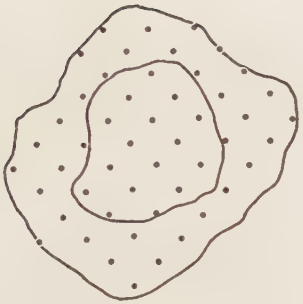
c) $3,144 < c_{emp} = 3,810 < 4,343$
s) $s_{emp} = 0,026 < s_{sim} = 0,030$
q) q = 0,000

Abb.IV.27.b:
n = 50

c) $3,144 < c_{emp} = 3,787 < 4,343$
s) $s_{emp} = 0,028 < s_{sim} = 0,030$
q) q = 0,000

b) Die regelmäßige Verteilung

Regelmäßige Verteilungen sind durch periodisch wiederkehrende Abstände gekennzeichnet, die dazu führen, daß die kumulative Dichteverteilung der beobachteten Abstände die Form einer Treppenfunktion annimmt.
Das in Abbildung IV.28. dargestellte Modell einer regelmäßigen Verteilung zeigt den typischen Kurvenverlauf, wobei sich vor allem Überschreitungen der unteren Grenze der entsprechenden zufälligen Verteilung ergeben. Die statistischen Parameter c, s und q ergaben - wie die deskriptive Kurvenbeurteilung - keine Anpassung an einen Poisson-Prozess. Die Summe der empirischen Abstände c_{emp} ist größer als die Summe der simulierten Abstände, das Supremum s_{emp} der empirischen kumulativen Dichtefunktion ist größer als das Supremum s_{sim} der theoretischen Funktion und dementsprechend treten Überschreitungen q der empirischen Funktion über die Grenzen der theoretischen Funktion auf.



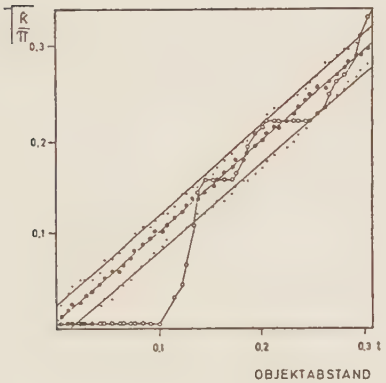


ABB.IV.28.
MODELL EINER REGELMÄßIGEN VERTEILUNG

50 Punkte wurden in regelmäßigen Abständen auf dem Modellmonozyten verteilt. Die empirische, kumulative Dichteverteilung (O) nimmt die Form einer Treppenfunktion an.

Die Ergebnisse der statistischen Tests:

Abb.IV.28.:

n = 50

c) $3,144 < c_{emp} = 6,201 > 4,343$

s) $s_{emp} = 0,108 > s_{sim} = 0,030$

q) $q = 0,38$

c) Die segregierte Verteilung

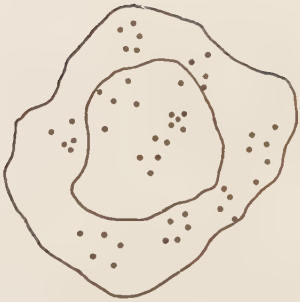
Segregierte Verteilungen von Molekülen auf einer Zelloberfläche wurden aufgrund biologischer Kriterien in zwei unterschiedliche Formen einteilen.
Wenn als "cluster" bezeichnete Aggregate von Molekülen nachgewiesen werden sollen, so müssen die Abstände zwischen den einzelnen Punkten, die die Elemente eines Aggregats bilden, in der Moleküldimension liegen. Den autoradiographischen Gegebenheiten angepasst, wurden daher wurden daher "cluster" Modelle mit mittleren Abständen von 0,2 bis 0,5 µm erstellt.
Segregierte Verteilungen von zelloberflächenassoziierten Molekülen könnten aber auch auf andere biologische Ursachen zurückgeführt werden. In Kapitel IV.5.2.1. (Seite 136) wurde der Einfluß des Spreitungszustands auf die Silberkorndichte in der Plasmamembran der Monozyten erörtert. Nicht nur dieser Effekt, sondern auch mögliche Zellpolaritäten sollten sich in Domänen unterschiedlicher Moleküldichte manifestieren, die aber keine Aggregate dieser Moleküle beinhalten.
Bei der Modellerstellung wurden beide Formen der segregierten Verteilung überprüft. Außerdem wurde der Einfluß, den die Gesamtpunktzahl auf die Beurteilung der Verteilung ausübt, berücksichtigt, um die Empfindlichkeit der Abstandsmethode abschätzen zu können.

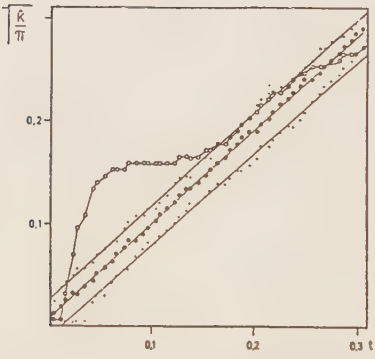
c_1) "cluster"

Aus der Definition eines "clusters" geht hervor, daß bei solchen Aggregaten eine Anhäufung von sehr kleinen Abständen auftritt. Daher zeichnen sich die kumulativen Dichteverteilungen ihrer Abstände - wie auch von RIPLEY (1977) beschrieben - dadurch aus, daß sie im Bereich kurzer Abstände ($t \leq 0{,}15$) oberhalb der oberen Grenze der theoretischen Kurve verlaufen. Dieser Kurvenverlauf läßt sich bei allen segregierten Verteilungen, die ein "cluster" beschreiben, nachvollziehen.
Bei der Erzeugung von Modellen, die segregierte Verteilungen

in der Form von "clustern" beschreiben, wurden verschiedene Parameter, die Abstände der Punkte innerhalb eines "clusters", die Anzahl der "cluster" und die Anzahl der "cluster"-Elemente, berücksichtigt.

Die in Abbildung IV.29 a und b gegenübergestellten "cluster"-Modelle verdeutlichen, welchen Einfluß die Abstände der Punkte innerhalb eines "clusters" auf den Verlauf der empirischen Dichtefunktion ausüben.
Im Modell IV.29 a waren die Abstände zwischen den pro "cluster" vorliegenden Punkten eng; die 10 "cluster" hoben sich so bereits beim Betrachten des Punktmusters deutlich von den umgebenden, punktfreien Bereichen ab. Die Dichteverteilung der empirischen Objektabstände überschritt vor allem bei kleinen Abständen ($t \leq 0{,}15$) die obere Grenze der theoretischen Funktion. Die empirisch bestimmten Werte der Parameter s und c waren größer als die Referenzwerte, die sich aus den Simulationen ergaben, die absolute Überschreitung (q) der empirischen Dichteverteilung über die Simulationsgrenzen lag bei 50%.
In Modell IV.29.b wurden die Punktabstände innerhalb der vorliegenden 10 "cluster" gegenüber Modell IV.29.a um den Faktor 2-3 aufgeweitet. Die einzelnen "cluster" überdeckten daher größere Flächen und waren nicht mehr scharf gegen die benachbarten "cluster" abgegrenzt. Aber auch bei diesem Beispiel einer Aggregatbildung war es möglich, eine eindeutig segregierte Verteilung nachzuweisen.
Beide in der Abbildung IV.29 a und b dargestellten Modelle stellen Beispiele einer alle auftretenden Elemente umfassenden "cluster" Bildung dar, die den von SCHLESSINGER und Mitarbeitern (1978) für Hormon-Rezeptor-Komplexe beschriebenen "patch"-Bildungen ähneln.





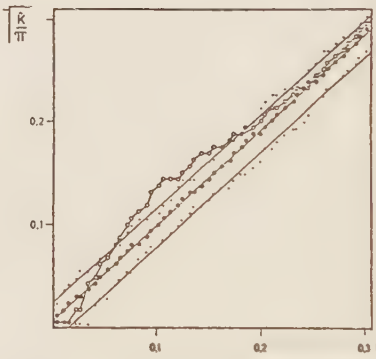


ABB.IV.29.a & b

MODELLE SEGREGIERTER VERTEILUNGEN : "CLUSTER"

Auf dem Modellmonozyten wurden 50 Punkte in Form von 10 "clustern" mit je 5 Punkten verteilt. Beim Modell IV.29.a liegen enge Abstände zwischen den jeweiligen Punkten eines "clusters" vor, beim Modell IV.29.b. grenzen sich die einzelnen "cluster" durch die Vergrößerung der Punktabstände innerhalb eines "clusters" nicht mehr so deutlich gegeneinander ab. Bei beiden Beispielen verläuft die empirische, kumulative Dichteverteilung (○) teilweise oberhalb der Grenze (●) der entsprechenden zufälligen Verteilung (●).

Die Ergebnisse der statistischen Tests:

Abb.IV.29.a:
n = 50

c) $3,144 > c_{emp} = 1,2979 < 4,343$
s) $s_{emp} = 0,093 > s_{sim} = 0,030$
q) q = 0,54

Abb.IV.29.b:
n = 50

c) $3,114 > c_{emp} = 3,009 < 4,343$
s) $s_{emp} = 0,040 > s_{sim} = 0,030$
q) 0,38

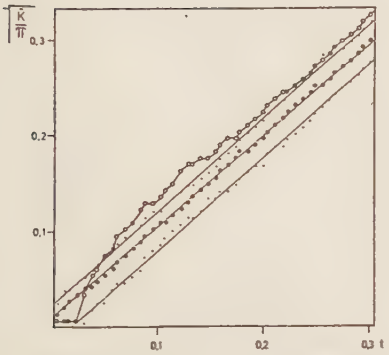
Neben diesen vollständigen "cluster" Bildungen wäre aber auch denkbar, daß entweder die Anzahl der "cluster", die Anzahl der "cluster" Elemente oder beides verringert ist. Um die Empfindlichkeit der Abstandmethode aufzuzeigen, wurden Modelle mit variierenden Parametern, wobei auch die Gesamtpunktzahl berücksichtigt wurde, erstellt.

In Modell IV.30.a ist die Anzahl der "cluster" auf ein "cluster" innerhalb einer zufälligen Verteilung reduziert worden. In einem begrenzten Bereich trat eine verglichen mit der Umgebung höhere Punktdichte auf, die etwa 25% der Gesamtpunktzahl ausmachte, während alle anderen Punkte mittels Zufallsgenerator verteilt wurden. Die empirische Abstandsverteilung verlief auch hier zu einem großen Teil oberhalb der Grenze der theoretischen Dichtefunktion.
Ein Verminderung der Anzahl der "cluster"-Elemente in dem in Abb.IV.30.a dargestellten Verteilungsmuster auf nur noch 10% der Gesamtpunkte, zeigte die untere Grenze der "cluster" Detektion bei dieser verhältnismäßig hohen Gesamtpunktdichte (~50 Punkte/ Zelloberfläche). Das in der Abb. IV.30 b dargestellte kleine "cluster" innerhalb einer zufälligen Verteilung war gerade noch anhand des Kurvenverlaufs der empirischen Dichtefunktion zu erkennen.

Bei den bisher vorgestellten "cluster" Modellen lag eine Punktdichte von etwa 50 Punkten/Auswertungsfläche vor. Autoradiogramme mit Silberkorndichten in dieser Größenordnung sollte somit eine zuverlässige Abschätzung der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auf der Monozytenoberfläche ermöglichen. Bei einigen Autoradiogrammen fanden sich allerdings Monozyten mit nur etwa der Hälfte an Silberkörnern auf der exponierten Oberfläche. Die Empfindlichkeit der Abstandsanalyse bei niedrigen Silberkorndichten war daher zu prüfen.
Eine Abnahme der Punktdichte auf 20 bzw. 15 Silberkörner pro Zellhälfte ermöglichte sowohl bei der Ausbildung mehrerer Aggregate (Abb. IV.31 a und b) als auch bei nur einer inner-

halb einer zufälligen Verteilung liegenden Anhäufung von Punkten noch die Detektion eines "clusters" (Abb.IV.32 a und b).
Damit muß auch bei verhältnismäßig geringen Silberkorndichten die Detektion eines "clusters" möglich sein. Allerdings wird der Nachweis eines "clusters" unempfindlicher, wenn die Gesamtpunktzahl sinkt. Die Modelle, die in der Abb.IV.32.a und b dargestellt sind, liegen nahe der unteren Grenze, bei der eine "cluster" Detektion bei einer Gesamtpunktzahl von 15 oder 20 Punkten noch möglich ist. Anhand verschiedener Modelle, die hier nicht abgebildet wurden, konnte die untere Grenze des "cluster" Nachweises im Bereich geringer Punktdichte (15-30 Punkte) annähernd angegeben werden; sie liegt bei "cluster" Größen, die etwa 20-25% der Gesamtpunktzahl umfassen. Unter diesen Prämissen ließen sich Verteilungsanalysen an allen vorliegenden Autoradiogrammen durchführen, erst bei Silberkorndichten unter 15 Silberkörnern wurde die Beurteilung der Verteilung kritisch. Das zuverlässige Auffinden von "clustern" war in diesem Bereich aufgrund der geringen Punktzahl und der sehr breiten Grenzen der zufälligen Verteilung nicht mehr gewährleistet.

Bei der "cluster" Bildung kann ein Sonderfall, die Dimerenbildung, auftreten. Die zuverlässige Detektion von Dimeren war mit der Abstandsmethode erst möglich, wenn etwa 25% der insgesamt vorliegenden Punkte als Dimere auftraten (vergl. Modell IV.33.). Der Kurvenverlauf der empirischen, kumulativen Dichteverteilung lag auch in diesem Fall nur knapp oberhalb der oberen Grenze der theoretischen Funktion.
Der deutlich treppenförmige Verlauf der Kurve wies auf die Überlagerung einer segregierten Verteilung, die auf die innerhalb der Dimeren auftretenden Häufung kurzer Abstände zurückzuführen war, mit einer regelmäßigen Verteilung, die durch die Häufung der Dimer-Dimer Abstände zurückzuführen war, hin.



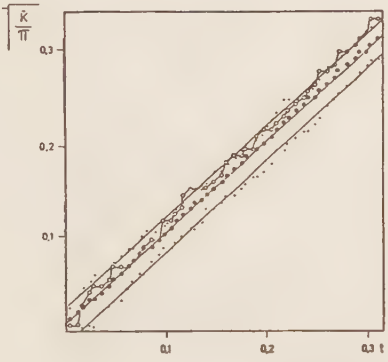


ABB.IV.30.a & b

MODELLE SEGREGIERTER VERTEILUNGEN : "CLUSTER"

In Modell IV.30.a wurde ein einzelnes "cluster" von 13 Punkten in eine zufällige Verteilung von weiteren 37 Punkten integriert. In Modell IV.30.b wurde dasselbe zufällige Punktmuster gewählt, aber die Zahl der "cluster"-Elemente wurde verringert. Während die empirische, kumulative Dichteverteilung (○) in Modell IV.30.a deutlich oberhalb der Grenze (●) einer zufälligen Verteilung (●) verläuft, übt das in Modell IV.30.b vorliegende reduzierte "cluster" einen so geringen Einfluß auf den Verlauf der empirischen Verteilung (○) aus, daß die Dichteverteilung nur noch an einigen Stellen geringfügig oberhalb der theoretischen Grenze liegt.

Die Ergebnisse der statistischen Tests:

Abb.IV.30.a:	Abb.IV.30.b:
n = 47	n = 50
c) $3{,}017 < c_{emp} = 3{,}798 < 4{,}110$	c) $3{,}144 < c_{emp} = 4{,}047 < 4{,}343$
s) $s_{emp} = 0{,}039 > s_{sim} = 0{,}029$	s) $s_{emp} = 0{,}017 < s_{sim} = 0{,}030$
q) q = 0,75	q) 0,08

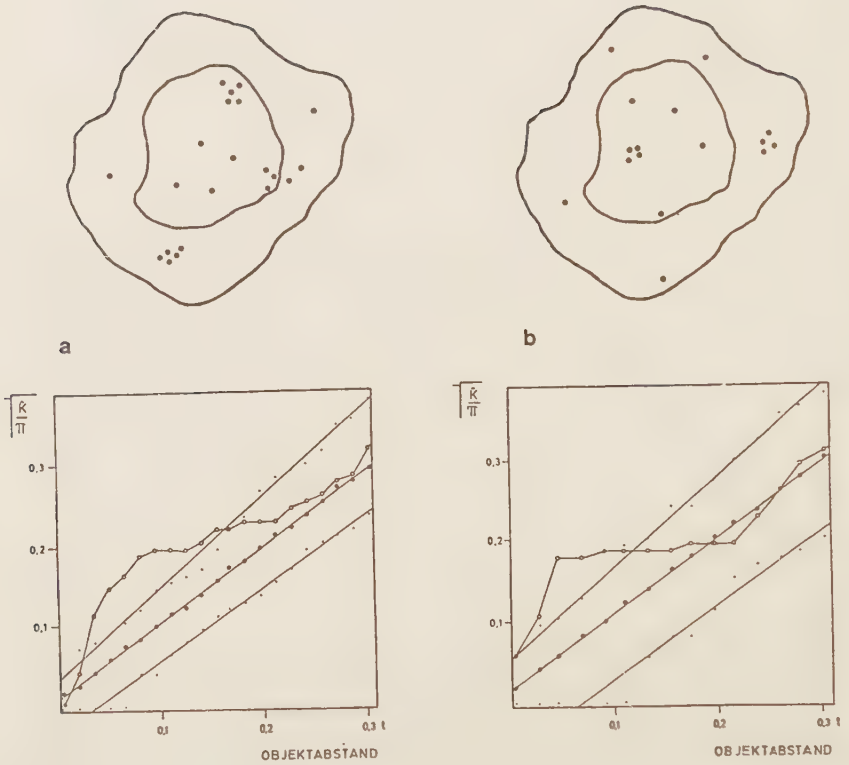
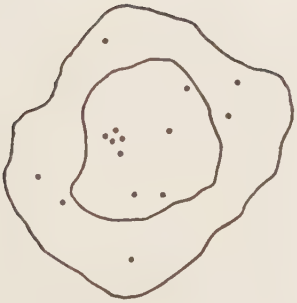


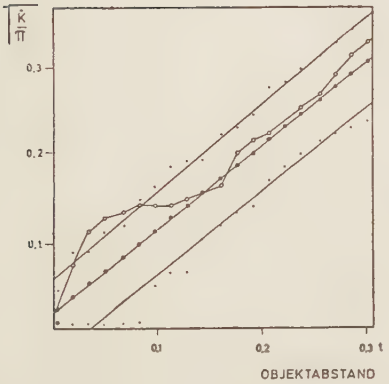
ABB.IV.31.a & b
"CLUSTER"-MODELLE BEI GERINGER PUNKTZAHL

Die Abb.IV.31.a zeigt bei insgesamt 21 Punkten drei "cluster" zu je 5 Elementen, sodaß die Anhäufungen etwa 70% der vorliegenden Punkte umfassen.
Die Abb.IV.31.b zeigt bei insgesamt 16 Punkten zwei "cluster" zu je 4 Elementen, sodaß die Anhäufungen 50% der vorliegenden Punkte umfassen.
In beiden Fällen überschreitet die empirische, kumulative Dichteverteilung (○) die obere Grenze (•) der zufälligen Verteilung (●).

a



b



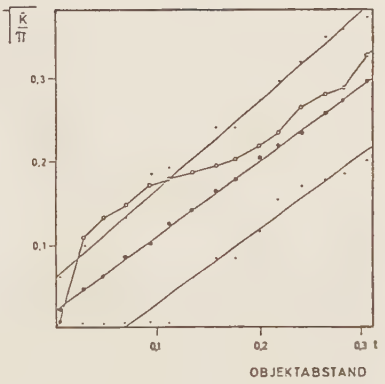
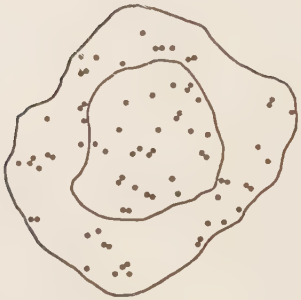


ABB.IV.32.a & b
"CLUSTER"-MODELLE BEI GERINGER PUNKTZAHL

Auf dem Modellmonozyten liegt jeweils ein "cluster" von 5 Punkten in einer Gesamtheit von 20 (IV.32.a) bzw. 15 (IV.32.b) zufällig verteilten Punkten vor, sodaß im einen Fall 25% und im anderen Fall 33% der Punkte "cluster" Elemente darstellen.
In beiden Fällen überschreitet die empirische, kumulative Dichteverteilung (○) die obere Grenze (•) der zufälligen Verteilung (●).



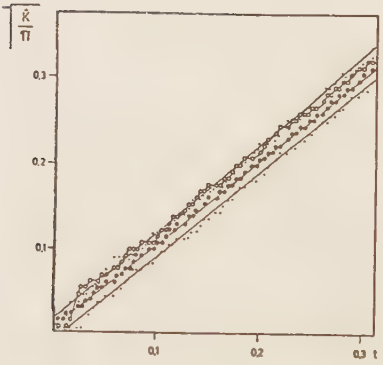


ABB.IV.33.

MODELL EINER SEGREGIERTEN VERTEILUNG: DIMERE

Innerhalb einer zufälligen Verteilung von 57 Punkten wurden 20 Dimere erzeugt, sodaß bezogen auf die Gesamtzahl etwa 25% der Punkte Dimere bilden. Die empirische, kumulative Dichteverteilung (○) verläuft oberhalb der Grenzen (•) einer zufälligen Verteilung (●) und ist somit als segregierte Verteilung zu betrachten, sie zeigt aber auch einen deutlichen treppenförmigen Verlauf, der auf eine regelmäßige Komponente schließen läßt.

Die Ergebnisse der statistischen Tests:

Abb.IV.33.:

n = 71

c) $3,907 > c_{emp} = 2,987 < 4,955$

s) $s_{emp} = 0,020 > s_{sim} = 0,018$

q) $q = 0,07$

c_2) "Domänen unterschiedlicher Dichte"

Die als "Domänen unterschiedlicher Dichte" bezeichneten Verteilungen zeichnen sich dadurch aus, daß sie sich in große Bereiche unterschiedlich hoher Punktdichten einteilen lassen, wobei die Punkte in keinem Bereich Aggregate von Molekülen bilden, sondern eher lokale Konzentrationsunterschiede reflektieren.

Das Modell IV.34 stellt ein Beispiel dieser Art der segregierter Verteilung vor, wobei die Punkte so auf der Oberfläche verteilt wurden, daß 75% auf der einen und nur 25% der Punkte auf der anderen Hälfte der ausgewerteten Fläche vorlagen. Auch bei diesem Verteilungstyp überschritt die empirische, kumulative Dichteverteilung die obere Grenze der zufälligen Verteilung. Da die Punkte innerhalb der Domänen zufällig verteilt waren, trat, anders als bei einem typische "cluster", in diesem Fall eine Häufung größerer Punktabstände auf, sodaß die empirische Kurve erst ab einem bestimmten Objektabstand ($t > 0,15$) oberhalb der oberen Grenze der zufälligen Verteilung verlief. Verteilungen, die diesen Kurvenverlauf zeigten, wurden im folgenden grundsätzlich dem Typ der "Domänen unterschiedlicher Dichte" zugeteilt.
Aus der Darstellung der empirischen, kumulativen Dichteverteilung geht die Lokalisation der Domänen nicht hervor; dies kann nur anhand des tatsächlichen Verteilungsmusters vorgenommen werden.

Die in Kapitel IV.5.2.1. (Seite 136) vorgestellten, bei "hohen" Monozyten auftretenden unterschiedlichen Silberkorndichten in den beiden morphologisch unterscheidbaren Domänen Kernareal und Plasmasaum müßten mit der Abstandsmethode ebenfalls als "Domänen unterschiedlicher Dichte" erkannt werden.
Um den Einfluß eines Dichtegefälles auf der Zelloberfläche zu prüfen, wurden daher Modelle erstellt, bei denen die Silberkorndichten auf dem Kern sukzessiv erhöht wurden.
Bei Modell IV.35.a wurden die Punkte sowohl auf dem Kernbe-

reich als auch auf dem Plasmasaum zufällig verteilt, aber die Punktdichten auf Kern und Plasmasaum standen im Verhältnis von 1 : 0,75. Diese empirische Abstandsverteilung wurde anhand des Kurvenverlaufs als zufällig bewertet. Die verhältnismäßig geringe Erhöhung der Punkt- bzw. Silberkorndichte auf dem Kernareal, die auch bei vielen "flachen" Monozyten zu beobachten war, verursachte offenbar keine Überschreitung der oberen Grenze der theoretischen Verteilung.

In Abbildung IV.35.b ist ein Dichteverhältnis zwischen Kernbereich und Plasmasaum von 1 : 0,5 dargestellt. Dieser häufig bei der Gruppe der "hohen" Monozyten auftretende Dichteunterschied übte einen nicht mehr zu vernachlässigenden Einfluß auf den Kurvenverlauf aus. Wie es für "Domänen unterschiedlicher Dichte" typisch ist, überschritt die empirische Kurve im Bereich großer Objektabstände ($t < 0{,}20$) die obere Grenze der theoretischen Kurve.

Bei einer weiteren Erhöhung der Punktdichte auf dem Kernareal war der Einfluß der Dichteunterschiede noch deutlicher zu erkennen. Bei Punktdichten zwischen Kernbereich und Plasmasaum im Verhältnis von 1 : 0,25 (Abb.IV.35.c) verlief die empirische Kurve weit oberhalb der Grenze der theoretischen Funktion.

Die Empfindlichkeit der Abstandsmethode ist allerdings bei der Detektion von "Domänen unterschiedlicher Dichte" limitiert. Während sich bei der autoradiographischen Auswertung durch die Mittelung über etwa 30 gespreitete Monozyten auch bei einer mittleren Anzahl von 30-35 Silberkörnern Dichteunterschiede zwischen Kernareal und Plasmasaum aufzeigen ließen, konnte an der Einzelzelle bei 35 Gesamtpunkten kein Einfluß der Dichteunterschiede auf die empirische Abstandsverteilung festgestellt werden. Bei allen im Bereich von 20-35 Gesamtpunkten überprüften Dichteverhältnissen (1 : 0,75 bis 1 : 0,25) verlief die empirische Dichteverteilung innerhalb der Schranken ihrer theoretischen Funktion.

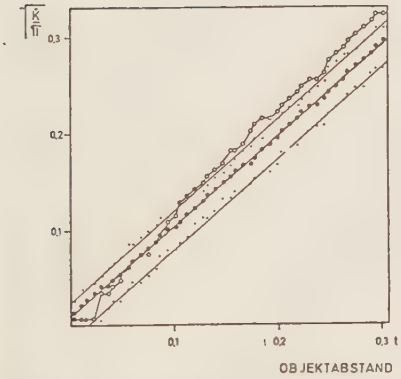


ABB.IV.34.

MODELL EINER SEGREGIERTEN VERTEILUNG: "DOMÄNE UNTERSCHIEDLICHER DICHTE"

Das Modell soll ein Beispiel für die "Domänen unterschiedlicher Dichte" geben, bei denen z.B. aufgrund von Zellpolaritäten Konzentrationsunterschiede in großen Bereichen der Zelloberfläche auftreten. In diesem Fall wurden 50 Punkte so angeordnet, daß auf einer Zellhälfte 3/4 und auf der anderen Zellhälfte nur 1/4 der gesamten Punkte vorlagen. Die empirische, kumulative Dichteverteilung (○) verläuft innerhalb der Grenzen (•) einer zufälligen Verteilung (●).

Die Ergebnisse der statistischen Tests:

Abb.IV.34.:

n = 47

c) $3{,}017 < c_{emp} = 3{,}858 < 4{,}110$

s) $s_{emp} = 0{,}032 > s_{sim} = 0{,}029$

q) $q = 0{,}62$

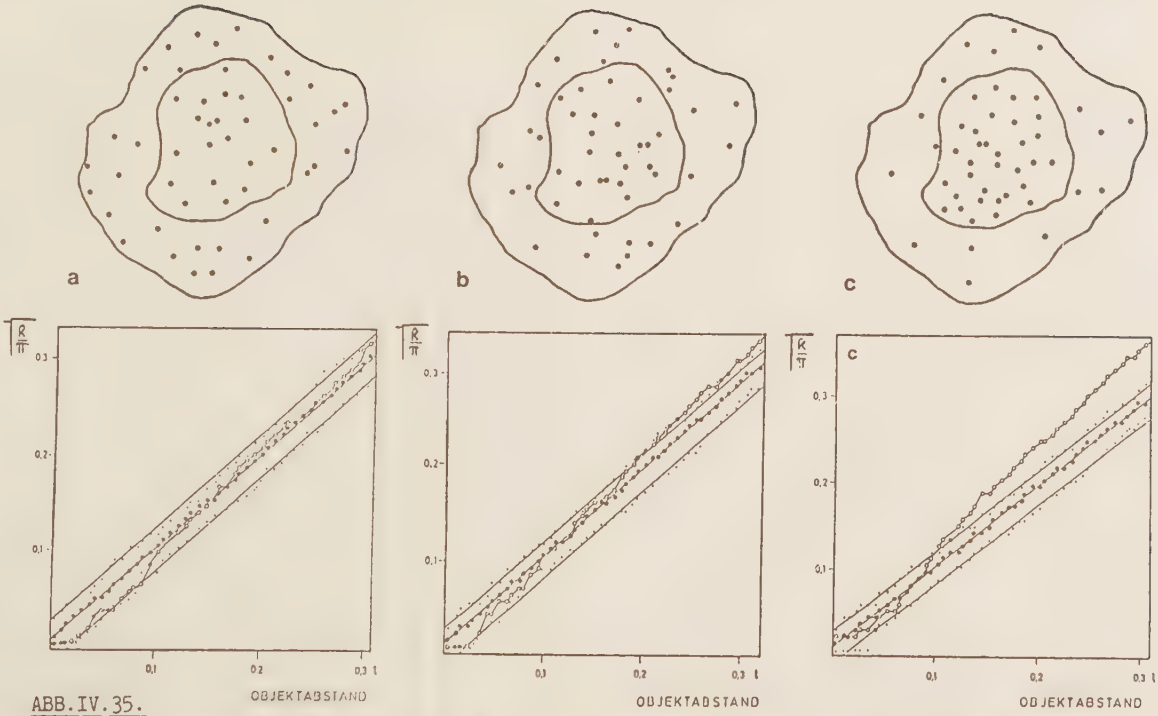


ABB.IV.35.

MODELLVERTEILUNGEN MIT IM VERGLEICH ZUM PLASMASAUM ERHÖHTEN SILBERKORNDICHTEN AUF DEM KERNAREAL

Die Abb.IV.35.a stellt eine Dichteverteilung zwischen Kernareal und Plasmasaum von 1 : 0,75 dar. Die empirische, kumulative Dichteverteilung (○) verläuft innerhalb der für eine zufällige Verteilung (●) beschrieben Grenzen (•). Die Abb.IV.35.b und c stellen Dichteverteilungen zwischen Kernareal und Plasmasaum von 1 : 0,5 bzw. 1 : 0,25 dar. Da in beiden Fällen die obere Grenze der zufälligen Verteilung im Bereich größerer Punktabstände überschritten wird, sind diese Verteilungen dem Typ der "Domänen unterschiedlicher Dichte" zuzuordnen.

Die statistischen Parameter c, s und q, die bei jedem Modell mitberechnet und bei einigen Modellen auch angegeben wurden, ergaben sowohl im Fall einer regelmäßigen als auch im Fall einer segregierten Verteilung keine Anpassung an eine Poisson-Verteilung. So umfaßte der Parameter q alle Überschreitungen der Simulationsgrenzen. Mit den statistischen Tests s und c konnte die Nullhypothese, die die empirische Verteilung als zufällig beschrieb, zu Gunsten einer Alternativhypothese verworfen werden. Sowohl beim Vorliegen eines "clusters" als auch bei Regelmäßigkeit wurde die Nullhypothese nicht akzeptiert. Daher war es nicht möglich, den empirischen Kurvenverlauf allein durch die statistischen Parameter c, s und q zu charakterisieren. Die wesentliche Unterscheidung, ob eine regelmäßige oder eine segregierte empirische Verteilung vorliegt und die zusätzliche Information, welchem Typ die segregierte Verteilung zuzuordnen ist, ließ sich nur deskriptiv erreichen; die statistischen Parameter werden daher im folgenden nicht mehr berücksichtigt.

IV.5.2.2.2. DIE EINTEILUNG DER INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEX VERTEILUNGEN AUF DER OBERFLÄCHE GESPREITETER MONOZYTEN IN ZUFÄLLIGE, REGELMÄßIGE UND SEGREGIERTE VERTEILUNGEN

Anhand der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Kriterien wurden die empirischen, kumulativen Dichteverteilungen der Silberkörner bzw. Insulinbindungsstellen, die in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen auf der Oberfläche gespreiteter Monozyten auftreten, in regelmäßige, zufällige und segregierte Verteilungsformen eingeteilt.
Die Tabelle IV.18. gibt die jeweils über mehrere Experimente gemittelten Anteile an regelmäßigen, zufälligen und segregierten Verteilungen der Insulinbindungsstellen für die verwendeten Inkubationsbedingungen an. In die Auswertung gingen aus den bereits aufgeführten Gründen nur "flache" Monozyten ein.

Die beobachteten Verteilungen erwiesen sich zum größten Teil als zufällig. In Abhängigkeit vom verwendeten Tracer und von den Inkubationsbedingungen fanden sich jedoch charakteristische Unterschiede im Verhältnis zwischen zufälligen und segregierten Verteilungen.
Beim Einsatz von MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin erwiesen sich die Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung im physiologischen Konzentrationsbereich von 10^{-9} mol Insulin/l bei allen Inkubationstemperaturen mit einem Anteil von etwa 90% als vorwiegend zufällig. Der Anteil an Monozyten mit einer regelmäßigen Anordnung von Insulin-Rezeptor-Komplexen lag bei diesen Bedingungen unter 5% und eine Tendenz zur Segregation war nur bei 2-10% der Verteilungen zu beobachten. Allerdings konnte bei den mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin durchgeführten Experimenten ein Einfluß der Insulinkonzentration auf das Verhältnis zwischen zufälligen und segregierten Verteilungen beobachtet werden. Eine Erhöhung der Insulinkonzentration auf 10^{-8} mol/l ließ den Anteil an segregierten Verteilungen ansteigen. Bei 15°C fanden sich bereits ~20% segregierte Verteilungen. Höhere

Inkubationstemperaturen führten zu einer weiteren Zunahme, sodaß bei 25 und 37°C knapp 30% der empirischen, kumulativen Dichteverteilungen die obere Grenze der Poisson-Verteilung überschritten.
Die Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung der mit RANDOM-markiertem Insulin durchgeführten Experimente erwies sich - in dem Bereich, in dem Versuche durchgeführt wurden - als unabhängig von den Inkubationsbedingungen. Aber bereits bei der niedrigen Inkubationstemperatur von 15°C sowie einer physiologischen Insulinkonzentration (10^{-9} mol/l) überschritten zwischen 20 und 30% der empirischen Verteilungen die obere Grenze der theoretischen Kurve. Dieser Anteil an segregierten Verteilungen blieb aber sowohl bei einer Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 25°C als auch bei einer Erhöhung der Insulinkonzentration (10^{-8} mol/l, 15°C) annähernd konstant.
Die Abbildungen IV.36-38 geben Beispiele für zufällige und segregierte Verteilungen der Silberkörner bzw. Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Oberfläche "flacher" Monozyten bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen.

Keine der segregierten Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen "flacher" Monozyten zeigte den typischen Kurvenverlauf einer Anhäufung von mehreren "clustern" entsprechend dem Modell IV. 29.a (Seite 150).
Die segregierten Verteilungen ähnelten in ihrem Kurvenverlauf eher den Modellen IV.30. a & b (Seite 153) oder IV.35.b (Seite 160), deren empirische Dichteverteilungen jeweils nur geringfügig oberhalb der Grenze der theoretischen Funktion zu finden waren.
Trotz der geringfügigen Uberschreitungen der oberen Grenze der zufälligen Verteilung konnte beurteilt werden , ob die vorliegenden segregierten Silberkornverteilungen "clustern" und "Domänen unterschiedlicher Dichte" entsprachen. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß sich insgesamt nur sehr wenige Zellen überhaupt als segregiert erwiesen.
Beim Random-markierten Insulin lag etwa die Hälfte der segre-

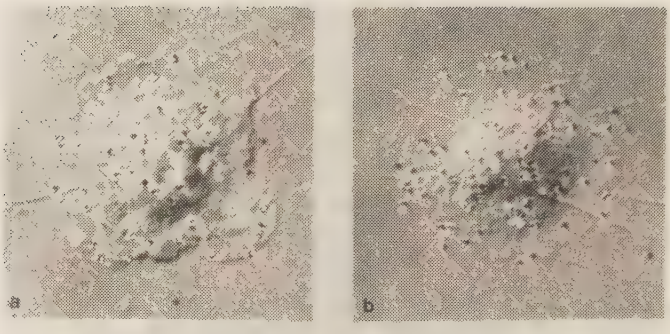
gierten Verteilungen in Form von "clustern" und die andere Hälfte in Form von "Domänen unterschiedlicher Dichte" vor. Beim MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin zeichnete sich die Tendenz ab, daß bei hohen Insulinkonzentrationen (10^{-8} mol/l) ein größerer Teil der segregierten Verteilungen (70-80%) der Verteilungsform von "Domänen unterschiedlicher Dichte" zuzurechnen waren. Da bei "flachen" Monozyten keine gravierenden Dichteunterschiede zwischen Kernareal und Plasmasaum vorlagen, könnten diese Verteilungen Verschiebungen der Silberkörner und somit der Insulin-Rezeptor-Komplexe in verschiedene Oberflächenbereiche reflektieren. Dies ließ sich durch das Betrachten der empirischen Silberkornverteilung zum Teil bestätigen. Der Anteil an "clustern" war bezogen auf die Gesamtheit der Verteilungsformen beim Einsatz von MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin unabhängig von den Inkubationsbedingungen gering und umfasste zwischen 3 und 5% aller vorkommenden Verteilungen.

TABELLE IV.18.

PROZENTUALER ANTEIL REGELMÄßIGER, ZUFÄLLIGER UND SEGREGIERTER VERTEILUNGEN AUF "FLACHEN" GESPREITETEN MONOZYTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN

Ink.-temp.	Insulin-konz.	RANDOM-markiertes Insulin				MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin			
			Verteilungsform				Verteilungsform		
(C)	(mol/l)	n	regelmäßig (%)	zufällig (%)	segregiert (%)	n	regelmäßig (%)	zufällig (%)	segregiert (%)
15	$\leq 10^{-9}$	2	-	73,8 ± 5,7	26,3 ± 5,7	3	4,9 ± 5,9	86,4 ± 3,3	9,6 ± 2,6
15	$\geq 10^{-8}$	2	-	66,6 ± 11,0	33,5 ± 11,0	2	2,5 ± 3,5	76,2 ± 1,6	21,4 ± 1,9
25	10^{-9}	1	4,5	63,7	31,8	2	1,2 ± 1,6	92,5 ± 4,2	6,4 ± 5,8
25	10^{-8}	0	n. b.	n. b.	n. b.	1	4,5	68,2	27,3
37	10^{-9}	0	n. b.	n. b.	n. b.	3	2,5 ± 2,3	91,5 ± 4,2	6,0 ± 3,8
37	10^{-8}	0	n. b.	n. b.	n. b.	1	-	72,7	27,3

n = Anzahl autoradiographischer Bestimmungen, n. b. = nicht bestimmt



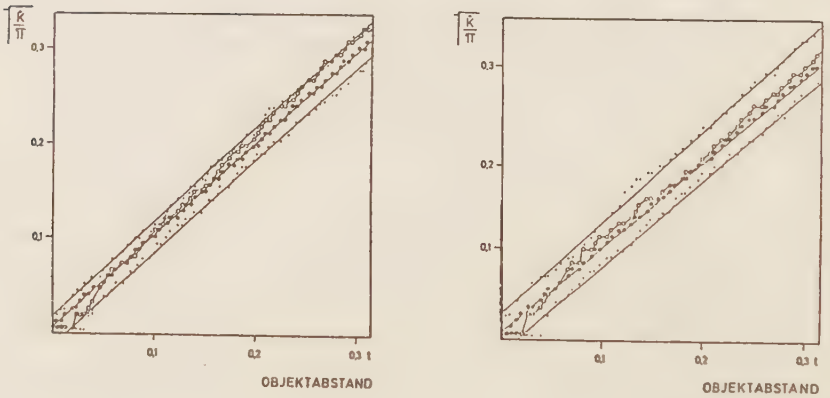
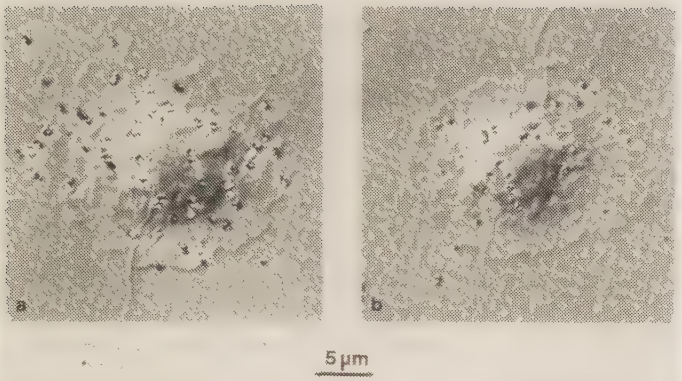


ABB.IV.36.

ZUFÄLLIGE VERTEILUNGEN VON INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEXEN AUF DER OBERFLÄCHE "FLACHER" GESPREITETER MONOZYTEN, DIE BEI 15°C UND 10^{-9} MOL MONO-125I-(TYR-A14)-INSULIN/L INKUBIERT WURDEN

Die empirischen, kumulativen Dichteverteilungen (○) überschreiten in beiden Fällen die Grenzen (•) der zufälligen Verteilung (●) nicht. Die Expositionszeit dieser Autoradiogramme betrug 50 Tage, die mittlere Silberkorndichte lag bei 43,8 ± 12,1 Silberkörnern/Zellhälfte, wobei 12,6% des Gesamtsignals auf hochenergetische Elektronen zurückzuführen waren.



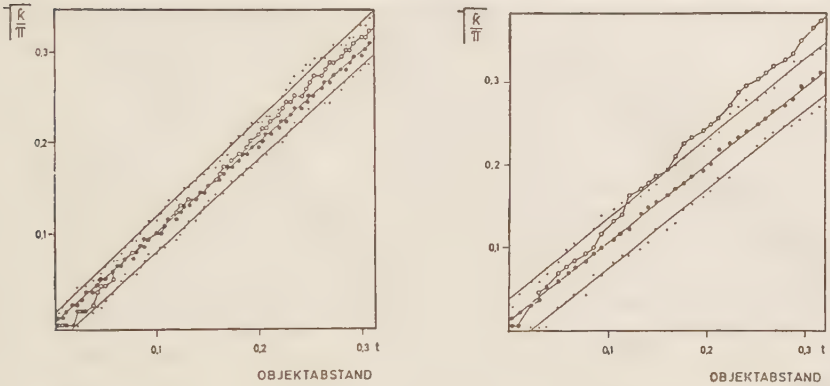
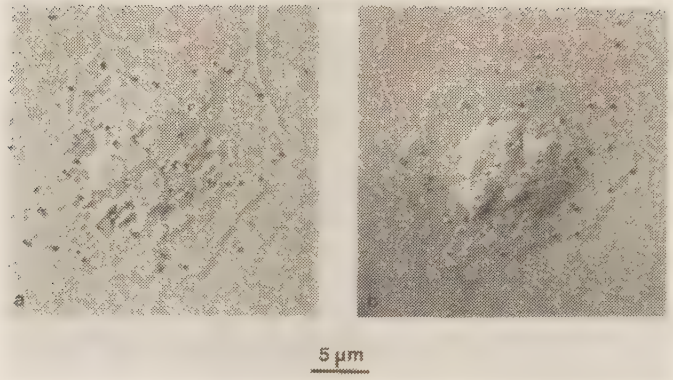


ABB.IV.37.
ZUFÄLLIGE UND SEGREGIERTE VERTEILUNGEN VON INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEXEN AUF DER OBERFLÄCHE "FLACHER" GESPREITETER MONOZYTEN, DIE BEI 25°C UND 10^{-8} MOL MONO-125I-(TYR-A14)-INSULIN/L INKUBIERT WURDEN

Während sich die empirische, kumulative Dichteverteilung (○) in Abb. IV.37.a als zufällig erweist, liegt in Abb. IV.37.b eine segregierte Verteilung vom Typ der "Domänen unterschiedlicher Dichte" vor, da die empirische, kumulative Dichteverteilung im Bereich größerer Silberkornabstände die obere Grenze (•) der zufälligen Verteilung (●) überschreitet. Die Expositionszeit dieser Autoradiogramme betrug 60 Tage, die mittlere Silberkorndichte lag bei 58,2 ± 18,8 Silberkörnern/Zellhälfte, wobei 18,6% des Gesamtsignals auf hochenergetische Elektronen zurückzuführen waren.



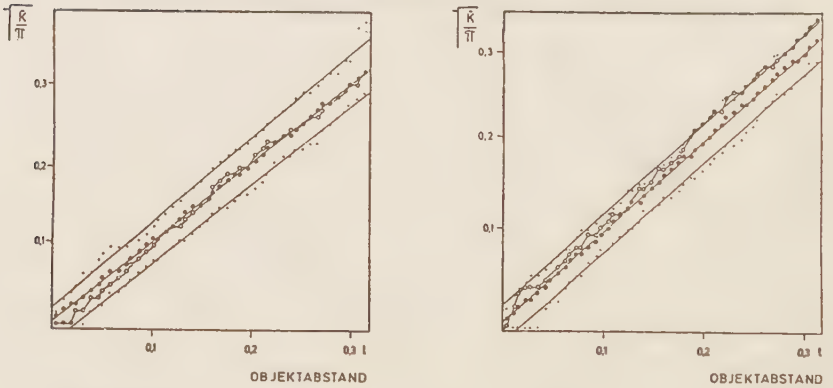


ABB.IV.38.

ZUFÄLLIGE UND SEGREGIERTE VERTEILUNGEN VON INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEXEN AUF DER OBERFLÄCHE "FLACHER" GESPREITETER MONOZYTEN, DIE BEI 37°C UND 10^{-9} MOL MONO-125I-(TYR-A14)-INSULIN/L INKUBIERT WURDEN

Während sich die empirische, kumulative Dichteverteilung (○) in Abb. IV.38.a als zufällig erweist, liegt in Abb.IV.38.b eine segregierte Verteilung von Typ der "Domänen unterschiedlicher Dichte" vor, da die empirische, kumulative Dichteverteilung im Bereich größerer Silberkornabstände die obere Grenze (•) der zufälligen Verteilung (●) überschreitet. Die Expositionszeit dieser Autoradiogramme betrug 150 Tage, die mittlere Silberkorndichte lag bei 52,3 ± 16,4 Silberkörnern/Zellhälfte, wobei 12,6% des Gesamtsignals auf hochenergetische Elektronen zurückzuführen waren.

An einigen ausgewählten Autoradiogrammen wurde die Verteilungsform der Insulinbindungsstellen auf der Oberfläche "mittlerer" und "hoher" Monozyten analysiert (vergl. Abb.IV.39).
Die Tabelle IV.19. stellt zwei mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin durchgeführte Experimente vor, wo nach Inkubationen bei 37°C und 10^{-9} bzw. 10^{-8} mol Insulin/l die Ortsverteilung der Silberkörner in Abhängigkeit von der Monozytengruppe bestimmt wurde. Der Anteil an segregierten Verteilungen nahm bei "hohen" Monozyten verglichen mit dem Anteil segregierter Verteilungen bei "flachen" Zellen um 30- 40% zu.
Auch bei Experimenten mit RANDOM-markiertem Insulin war eine Zunahme der segregierten Verteilungen in Anhängigkeit von der Höhe des Monozytenkerns zu beobachten.
Bei "mittleren" und "hohen" Monozyten setzten sich die segregierten Verteilungen fast ausschließlich aus "Domänen unterschiedlicher Dichte" zusammen. Die Zunahme dieses Verteilungstyps korreliert mit der apparenten Zunahme der Silberkorndichte auf dem Zellkern "mittlerer" und "hoher" Monozyten.
Es liegt nahe, die Zunahme an "Domänen unterschiedlicher Dichte" auf den Einfluß des Spreitungszustands zurückzuführen. Inwieweit bei "mittleren" und "hohen" Monozyten auch andere Ursachen für die Zunahme der segregierten Verteilungen verantwortlich sind, ließ sich nicht abschätzen.

Aufgrund hoher Silberkorndichten einiger Autoradiogramme und einer bei "flachen" Monozyten ausreichend großen Kernfläche war es möglich, die Silberkorn bzw. Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auf dem Kernareal zu untersuchen. In der Tabelle IV.20. wurde für jede Inkubationstemperatur ein Beispiel aufgeführt. Verteilungsanalysen auf dem Plasmasaum konnten mit der Abstandsmethode nicht durchgeführt werden.
Beim Einsatz von MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin erwiesen sich bei einer Insulinkonzentration von 10^{-9} mol/l alle Verteilungen von Insulinbindungsstellen auf dem Kern als zufällig, und selbst im unphysiologisch hohen Konzentrationsbereich

(10^{-8} mol/l) lag eine nur geringe Anzahl segregierter Ortsverteilungen vor. Auch beim Einsatz von RANDOM-markiertem Insulin fanden sich auf dem Kernbereich fast ausschließlich zufällige Verteilungen; so lagen nur 5% segregierte Verteilungen auf der Kernregion "flacher" Monozyten nach einer Inkubation bei 25°C und 10^{-9} mol RANDOM-jodiertem Insulin/l vor.
Das Auftreten von fast ausschließlich zufälligen Verteilungen, wenn das Beobachtungsfenster dem Kernbereich entspricht, kann dahingehend interpretiert werden, daß durch die Einschränkung auf einen bezüglich der Silberkorndichte homogenen Bereich der Einfluß der selbst bei "flachen" Monozyten leicht erhöhten, apparenten Silberkorndichte auf dem Kern (vergl. Tabelle IV.16., Seite 138) eliminiert wird. Dies läßt den Schluß zu, daß die Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Monozytenoberfläche weitgehend zufällig verteilt vorliegen.
Allerdings sollte berücksichtigt werden, daß im Bereich der auf dem Kern vorliegenden Silberkorndichten (~20 Silberkörner) die Detektion eines "clusters" nur möglich ist, wenn 20-25% der Gesamtelemente ein "cluster" bilden (vergl. Kapitel IV.5.2.2.1., Seite 152).

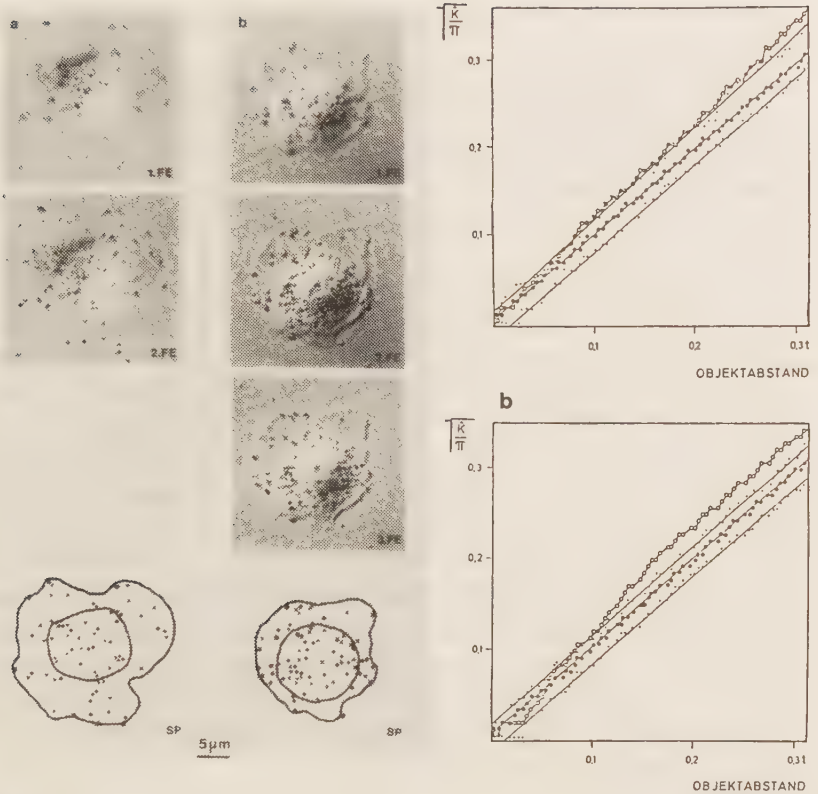


ABB.IV.39.
SEGREGIERTE VERTEILUNGEN VON INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEXEN AUF DER OBERFLÄCHE "MITTLERER" UND "HOHER" MONOZYTEN, DIE BEI 37°C UND 10^{-9} MOL MONO-125I-(TYR-A14)-INSULIN INKUBIERT WURDEN

Die Verteilung der Silberkörner bzw. Insulinbindungsstellen auf der Oberfläche "mittlerer" (IV.39.a) und "hoher" (IV.39.b) Monozyten erweist sich als segregiert. Da die empirischen, kumulativen Dichteverteilungen (○) jeweils im Bereich größerer Silberkornabstände die obere Grenze (●) der zufälligen Verteilung (●) überschreiten, sind sie dem Typ der "Domänen unterschiedlicher Dichte" zuzuordnen. Die Expositionszeit dieser Autoradiogramme betrug 150 Tage, die mittlere Silberkorndichte lag bei 52,3 ± 16,4 Silberkörnern/Zellhälfte, wobei 12,6% des Gesamtsignals auf hochenergetische Elektronen zurückzuführen waren.

TABELLE IV.19.

PROZENTUALER ANTEIL REGELMÄßIGER, ZUFÄLLIGER UND SEGREGIERTER VERTEILUNGEN IN DEN MONOZYTENGRUPPEN

Ink. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	Monozyten typ	Verteilungsform regelmäßig (%)	zufällig (%)	segregiert (%)	SK-Dichte Kernareal : Plasmasaum *
37	10^{-9}	"flach"	0,0	89,7	10,3	1 : 0,87
		"mittel"	-	-	-	1 : 0,86
		"hoch"	5,3	78,9	15,8	1 : 0,56
37	10^{-8}	"flach"	0,0	72,7	27,3	1 : 0,80
		"mittel"	2,9	57,1	40,0	1 : 0,51
		"hoch"	0,0	58,1	41,9	1 : 0,37

SK = Silberkörner, * in dieser Spalte sind die Dichteverhältnisse, die sich aus den auf eine konstante Fläche von 50 μm^2 bezogenen Silberkorndichten im Kernareal bzw. im Plasmasaum ergeben, aufgeführt (vergl. Kapitel IV.5.2.1. Seite 136). Bei allen in der Tabelle IV.19. und IV.20. aufgeführten Experimenten wurde MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin als Tracer verwendet.

TABELLE IV.20.

PROZENTUALER ANTEIL REGELMÄßIGER, ZUFÄLLIGER UND SEGREGIERTER VERTEILUNGEN AUF DEM KERNAREAL "FLACHER" MONOZYTEN

Ink. temp. (°C)	Insulin-konz. (mol/l)	n	SK/KF ± s	Verteilungsform regelmäßig (%)	zufällig (%)	segregiert (%)
15	10^{-9}	19	21,7 ± 4,8	0,0	100,0	0,0
25	10^{-8}	17	20,9 ± 4,4	11,8	82,4	5,9
37	10^{-9}	17	23,9 ± 4,9	0,0	100,0	0,0

SK/KF = Silberkörner/Kernfläche, n = Anzahl "flacher" Monozyten mit einer Silberkorndichte von 15 und mehr Silberkörnern auf der Kernfläche.

IV.5.2.2.3. DIE VERTEILUNGSANALYSEN MIT DER QUADRATMETHODE

Eine Alternative zur Untersuchung räumlicher Muster bot die Einteilung der Zelloberfläche in kleine Quadrate und die Bestimmung der pro Einheitsfläche auftretenden Silberkorndichten. Die Dichteverteilungen wurden mit einer Auswahl statistischer Tests auf ihre Anpassung an eine Poisson-Verteilung überprüft.
Die Quadratmethode sollte im Vergleich zur Bestimmung der Abstände nächster Nachbarn angewendet werden. Vor allem sollte das Maß an Übereinstimmung darin, welcher Teil der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen bei beiden Methoden zufällig oder segregiert vorlag, bestimmt werden.
Bei einem ausgewählten Experiment (Inkubationstemperatur = 25°C, 10^{-8} mol 125I-Insulin/l) wurde der Einfluß verschiedener Rastergrößen auf die Silberkorndichteverteilung untersucht. Die Oberfläche von 22 "flachen" Monozyten wurde mit einem 6,25, 4,00 und 2,56 μm^2 Raster in Sektionen eingeteilt.
Die Ergebnisse der Analysen sind in der Tabelle IV.21. zusammengefaßt.
Der Prozentsatz an Verteilungen bei denen der Quotient aus Varianz und Mittelwert nicht im Bereich von 0,9-1,1 lag und somit einer zufälligen Verteilung nicht mehr entsprach, erreichte bei allen Rastergrößen über 60%. Bei den Quadratgrößen 6,25 und 4,00 μm^2 fanden sich 20% und beim 2,56 μm^2 Raster 30% der Verteilungen mit einen Quotienten kleiner als 0,9, was auf eine regelmäßige Verteilung hinweist. Ein Vergleich zwischen den Rastergrößen zeigte, daß bei derselben Zelle je nach Rastergröße Quotienten von <0,9, >1,1 oder aus dem Bereich zwischen 0,9 und 1,1 auftraten.
Die beiden statistischen Tests, die Bestimmung des Dispersionsindexes I und des $\hat{\chi}^2$-Werts, die die Erfassung segregierter Verteilungen ermöglichten, ergaben in fast allen Fällen nur etwa 14% nicht zufällige Verteilungen, während mit der Abstandsmethode die doppelte Menge (27,3%) an segregierten Verteilungen nachgewiesen wurde.

Ein Vergleich der Einzelergebnisse zeigte, daß die Zellen, deren Dispersionsindex I oder $\hat{\chi}^2$-Wert auf eine nicht zufällige Verteilung verwies, nicht identisch waren. In der Abbildung IV.40.a-c ist an einem Beispiel dargestellt, daß nach dem Dispersionsindex I bei den größeren Rastern keine Anpassung an eine Poissonverteilung vorlag, während beim kleinsten Raster die empirische Verteilung laut Dispersionsindex I durch eine zufällige Verteilung beschrieben wurde.

Segregierte Verteilungen, die bei allen Rastergrößen entdeckt wurden, fanden sich nicht. Der Anteil an Monozyten, der nach der Quadratmethode segregierte Verteilungen aufwies, deckte sich nur in der Hälfte der Fälle mit dem Anteil an Monozyten, bei denen nach der Abstandsmethode segregierte Verteilungen vorlagen.

In der Tabelle IV.22. werden vier Experimente gegenübergestellt, bei denen die Anteile segregierter Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen sowohl mit der Abstands- als auch mit der Rasterquadratmethode (6,25 μm^2 Raster) ermittelt wurden. In allen Fällen zeigte der Dispersionsindex I verglichen mit der deskriptiven Abstandsanalyse nur etwa die Hälfte an segregierten Verteilungen an und der Anteil an Zellen, mit einem $\hat{\chi}^2$-Wert oberhalb der Grenze eines Poissonprozesses, erwies sich als noch geringer.
Das Gefälle in der Silberkorndichte zwischen Kern und Plasmasaum ließ sich mit der Rasterquadratmethode nicht erfassen. Bei "hohen" Monozyten war keine Zunahme der nicht mehr an eine Poisson-Verteilung anpassbaren Silberkorndichteverteilungen zu erkennen (siehe Beispiel, Tabelle IV.22.).

TABELLE IV.21.

PROZENTUALE ABWEICHUNG DER EMPIRISCHEN SILBERKORNDICHTEVERTEILUNGEN VON EINER ZUFÄLLIGEN VERTEILUNG - GETESTET MIT DEM QUOTIENTEN AUS VARIANZ UND MITTELWERT, DEM DISPERSIONSINDEX I UND DEM χ^2-TEST

Rastergröße (μm^2)	Anzahl ausgew. Quadrate	SK/R $\pm$ s	$s^2/\bar{x}$ < 0,9 (%)	$s^2/\bar{x}$ >1,1 (%)	$I > I_{0,05:F}$ (%)	$\hat{\chi}^2 > \chi^2_{0,05:F}$ (%)
6,25	37,8 $\pm$ 8,1	1,4 $\pm$ 1,2	22,7	40,9	13,6	13,6
4,00	59,6 $\pm$ 12,8	0,9 $\pm$ 1,0	22,7	40,9	13,6	13,6
2,56	97,3 $\pm$ 20,9	0,6 $\pm$ 0,7	31,8	31,8	13,6	4,5

SK/R = Silberkörner/Rasterquadrat, F = Freiheitsgrad

TABELLE IV.22.

PROZENTUALE ABWEICHUNGEN EMPIRISCHER SILBERKORNDICHTEVERTEILUNGEN VON ZUFÄLLIGEN VERTEILUNGEN VERGLICHEN MIT DEM ANTEIL SEGREGIERTER ABSTANDSVERTEILUNGEN

Ink. temp. (°C)	Insulinkonz. (mol/l)	$s^2/\bar{x}$ < 0,9 (%)	$s^2/\bar{x}$ > 1,1 (%)	$I > I_{0,05:F}$ (%)	$\hat{\chi}^2 > \chi^2_{0,05:F}$ (%)	segregierte Abstandsvert. (%)
15	10^{-8}	20,8	41,7	10,3	4,2	20,0
25	10^{-9}	14,8	29,6	7,4	3,7	2,3
25	10^{-8}	22,7	40,9	13,6	13,6	27,3
37	10^{-9}	24,1	44,8	6,9	3,4	10,3
37*	10^{-8}	22,7	68,2	13,6	0,0	27,3
37**	10^{-8}	20,9	48,8	14,0	4,6	41,9

* Diese Werte beziehen sich auf "flache" bzw. ** auf "hohe" Monozyten eines Experiments. Bei allen in den Tabellen IV.21. und IV.22. aufgeführten Experimenten wurde MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin als Tracer verwendet.

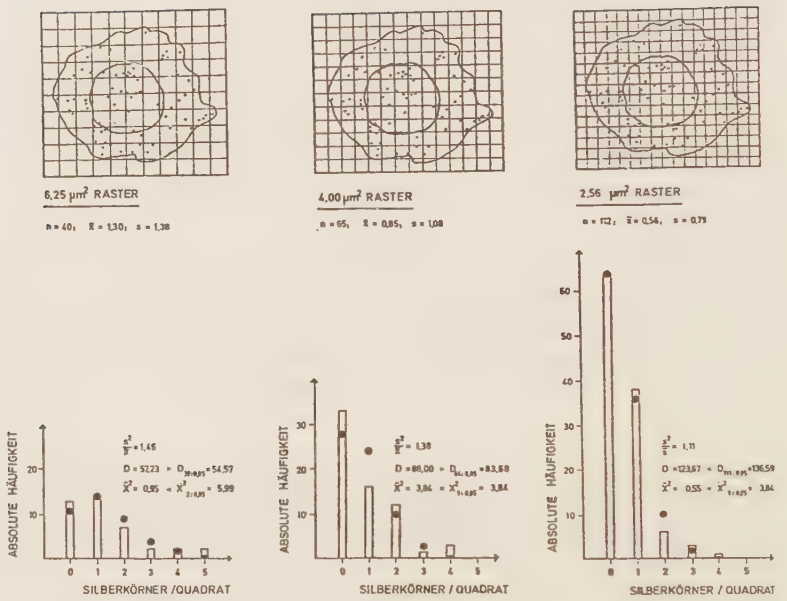


ABB.IV.40.

BEISPIEL FÜR DEN EINFLUß DER RASTERGRÖßE BEI DER BESTIMMUNG DER VERTEILUNGSFORM MITTELS QUADRATMETHODE

Die Oberfläche des ausgewählten Monozyten wurde mit einem 6,25 μm^2, einem 4,00 μm^2 und einem 2,56 μm^2 Raster unterteilt. Die jeweiligen Silberkorndichteverteilungen wurden in Histogrammform dargestellt.
Der Quotient aus Varianz und Mittelwert erweist sich grundsätzlich größer als beim Vorliegen einer zufälligen Verteilung zu erwarten ist.
Die Ergebnisse der statistischen Test zeigen, daß nach dem Dispersionsindex I bei der Einteilung mit den beiden größeren Rastern keine Anpassung der empirischen Verteilung an eine Poisson-Verteilung vorliegt, während die Einteilung mit dem kleinsten Raster eine Anpassung ergibt. Nach dem $\hat{\chi}^2$-Wert ergibt sich bei der Einteilung mit dem größten bzw. kleinsten Raster eine Anpassung an eine Poisson-Verteilung, während der $\hat{\chi}^2$-Wert beim mittleren Raster auf der 5% Grenze liegt.

V. D I S K U S S I O N

Die vorgestellte Arbeit sollte zur Klärung der Frage beitragen, ob bzw. unter welchen Bedingungen eine insulininduzierte Aggregation von Insulin-Rezeptor-Komplexen auf der Oberfläche insulinbindender Zellen zu beobachten ist.
Die bisher vorliegenden Befunde bezüglich der Verteilung von Insulin-Rezeptor-Komplexen in der Plasmamembran basieren auf Experimenten, die hinsichtlich des experimentellen Zugangs differieren. Zum einen wurden unterschiedliche Zellsysteme wie Fibroblasten und IM-9 Lymphozyten (SCHLESSINGER et al. 1978 & 1980) oder Adipozyten und Leberzellen (JARETT et al. 1980, GERSHON et al. 1981) verwendet. Zum anderen wurden unterschiedliche Tracer wie Fluoreszenzinsulin oder Ferritin-Insulin und, davon abhängig, unterschiedliche Detektionsmethoden wie die Fluoreszenzmikroskopie mittels bildverstärkender Videokamera bzw. Elektronenmikroskopie eingesetzt (SCHLESSINGER et al. 1978 & 1980, JARETT et al.1980, GERSHON et al. 1981). Die Beschreibung der Verteilungsmuster erfolgte hauptsächlich deskripitiv.
In der vorgestellten Arbeit wurden isolierte menschliche Monozyten als Zellsystem ausgewählt. Besondere Bedeutung wurde vor allem dem methodischen Zugang zur Darstellung des Verteilungsmusters der Insulin-Rezeptor-Komplexe beigemessen, wobei die Tracerqualität im Vordergrund stand. Der Einsatz von 125I-Insulin, vor allem von MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin, das dem nativen Insulin am nächsten kommt, führte dazu, daß als Detektionsmethode die lichtmikroskopische Autoradiographie (JUNGER 1979, JUNGER und BACHMANN 1980) gewählt wurde.
Die Analyse der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung beschränkte sich nicht nur auf die reine Beschreibung des Verteilungsmusters, sondern wurde durch den Einsatz eines statistischen Analyseverfahren (der Bestimmung "nächster Nachbarn") objektiviert.

Um eine zuverlässige Bewertung der mittels quantitativer lichtmikroskopischer Autoradiographie an Monozyten erhobenen Befunde zur Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung zu ermöglichen, sollten die Einflüsse, die durch das Zellsystem, den Tracer, die Detektionsmethode aber auch durch das statistische Analyseverfahren ausgeübt werden, bei der Beurteilung des Verteilungsmusters berücksichtigt werden.
In den folgenden Abschnitten werden daher die vorgestellten Ergebnisse jeweils unter einem der aufgeführten Aspekte diskutiert.

DIE BEDEUTUNG DES STATISTISCHEN ANALYSEVERFAHRENS FÜR DIE BESCHREIBUNG DER INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEX VERTEILUNG AUF MONOZYTEN

Viele Arbeitsgruppen beschränkten sich auf eine vergleichende Beschreibung licht- oder elektronenmikroskopisch sichtbarer Verteilungsphänomene. Es seien hier nur einige Beispiele angeführt: So wurden im Fall der Immunoglobulin-Rezeptor-Komplex Verteilung diffus verteilte, fluoreszenzmarkierte Komplexe bei niedrigen Temperaturen dem deutlichen "capping" auf einem Zellpol nach einer Inkubation bei 37°C gegenübergestellt (TAYLOR et al. 1971) oder Anhäufungen von α-Makroglobulin- oder LDL*-Rezeptor-Komplexen in "coated pits" anhand elektronenmikroskopischer Bilder aufgezeigt (WILLINGHAM et. al. 1979, ANDERSON et. al. 1977 und 1982).
Auch die von SCHLESSINGER und Mitarbeitern beschriebenen Insulin-, "EGF"-**, "NGF"-*** bzw. Thyreotropin-Rezeptor-Komplex Verteilungen wurden durch die vergleichende Gegenüberstellung lichtmikroskopischer Aufnahmen unterschiedlicher Inkubationsbedingungen erzielt. Bei tiefen Inkubationstemperaturen (4°C)

* LDL = "low density lipoprotein" ** EGF = "epidermal growth factor", *** NGF = "nerve growth factor".

oder vorfixierten Zellen fand sich ein diffuses Fluoreszenzsignal, bei nicht fixierten Zellen und einer Inkubationstemperatur von 37°C traten deutlich voneinander getrennte "cluster" auf (SCHLESSINGER et al. 1978, SHECHTER et al. 1978, SCHLESSINGER et al. 1980, LEVI et al. 1980, AVIVI et al. 1982).

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten lichtmikroskopischen Autoradiogramme kugelförmiger und gespreiteter Monozyten wiesen bei keiner der gewählten Inkubationsbedingungen deutlich sichtbare Ansammlungen von Silberkörnern bzw. Insulinbindungsstellen auf, die beobachteten Verteilungen erschienen vielmehr zufällig.

In Fällen, bei denen keine deutlich "sichtbaren" "cluster" auftreten, entsteht die Frage, ob tatsächlich keine Aggregate vorliegen, oder ob lediglich die Detektion aufgrund einer fehlenden mathematischen Beschreibung unmöglich war.
Um anhand der vorliegenden Daten eine zuverlässige Entscheidung treffen zu können, ob die besetzten Insulinrezeptoren segregiert oder zufällig verteilt auf der Oberfläche der Monozyten vorliegen, wurde daher ein statistisches Analyseverfahren eingesetzt, das die Zufälligkeit einer räumlichen Anordnung und ihre Abweichungen in Form von Regelmäßigkeit und Aggregation erfassen kann.
Prinzipiell ist es möglich, die Verteilung einer Population in einem bestimmten Bereich entweder durch das Vermessen von Abständen zwischen "nächsten Nachbarn" und Erstellen einer kumulativen Dichteverteilung dieser Abstände oder durch Rasterung einer gegebenen Fläche und Erstellen der vorliegenden Punktdichteverteilung zu untersuchen.
Der Abstandsmethode nach RIPLEY (1977) wurde allerdings der Vorzug gegeben, da die Methode vor allem beim Vorliegen einer limitierten Auswertungsfläche und kleiner Datenmengen zuverlässigere Aussagen über das Verteilungsmuster gewährleistet.
So fanden PERRY und MEAD (1979) eine mit der Größe der Raster-

quadrate zunehmende Stärke des statistischen Tests, die vor allem auf die steigende Konzentration an Ereignissen pro Quadrat zurückzuführen war. Da aber bei der vorgestellten Auswertung eine wesentliche Zunahme der Quadratgröße über 6 μm^2 zu weniger als 20 auswertbaren Quadraten pro Monozyt führen würde, ist die Aussagefähigkeit dieser Methode bei solch kleiner Auswertungsfläche, wie der Monozyt sie bietet, begrenzt.

Außerdem bestand bei der Anwendung der Quadratmethode das Problem der Auswahl geeigneter statistischer Tests, mit denen die empirische Punktdichteverteilungen auf Zufälligkeit überprüft werden können.

Mit dem Quotienten aus Varianz und Mittelwert, der als grobes Maß zur Abschätzung der Anpassung einer empirischen Verteilung an eine Poisson-Verteilung gilt (SACHS 1978), waren keine zuverlässigen Aussagen möglich.

Sowohl der χ^2-Test, als auch der Dispersionsindex I ergaben in etwa 90% der betrachteten Silberkorn- bzw. Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen auf der Monozytenoberfläche eine Anpassung an eine Poisson-Verteilung. Da der χ^2-Test aber in vielen Fällen ein ineffektives Kriterium für die Güte einer Anpassung darstellt (MEAD 1974) und außerdem einen großen Stichprobenumfang voraussetzt (SACHS 1978) scheint der χ^2-Test kein geeignetes Mittel zu sein, um die bereits aus dem Betrachten der Autoradiogramme zu entnehmende allenfalls geringe Tendenz zur Aggregation von Insulinbindungsstellen aufzudecken.

Dem Dispersionsindexes I, der als aussagefähiger Test auf Zufälligkeit gilt (RAO und CHAKRAVARTI 1957, PERRY und MEAD 1979), wurde eine größere Zuverlässigkeit in der Einteilung der empirischen Silberkorndichteverteilungen zugebilligt.

Im Vergleich zur Abstandsmethode erwies sich die Analyse des Verteilungsmusters mit dem Dispersionsindex I zwar als unempfindlicher, stimmte aber von der Tendenz mit ihr überein (vergl. Tabelle IV.22., Seite 175).

Bei der Abstandsbestimmung "nächster Nachbarn" wurden die kumulativen Dichteverteilungen der empirischen Abstände beobachteter Silberkörner, bzw. Insulinbindungstellen zueinander unter Annahme einer zufälligen Verteilung mit dem einfachsten von RIPLEY (1977) vorgeschlagenen Modell, der Poisson-Verteilung, verglichen.
Bei der Auswertung wurden alle in einer Einheitsfläche vorliegenden Punktpaare betrachtet, deren Abstand $t \leq 0{,}3$ war. Bei Zufälligkeit muß die kumulative Dichtefunktion der Abstände K(t) proportional zur betrachteten Kreisfläche mit dem Radius t sein.
Die Abständsmethode fand auch vor der Veröffentlichung von RIPLEY (1977) Anwendung (DIGGLE et al. 1976), aber ähnlich wie bei der Quadratmethode bestand das Problem, Signifikanz-Tests mit zufriedenstellender Auflösung zu etablieren, mit denen die empirische Dichteverteilung auf die Nullhypothese, das Vorliegen einer Poisson-Verteilung, geprüft wird. So war in vielen Fällen die Zuverlässigkeit solcher Tests nicht bekannt (MEAD 1974, DIGGLE et al. 1976). Erst mit der Veröffentlichung der Arbeit von RIPLEY (1977) wurde die quantitative Beschreibung eines Verteilungsmusters unter Umgehung kritischer Anpassungstests möglich. RIPLEY verglich vermittels synthetischer Daten die empirischen Ergebnisse mit einem gewählten Modell, wobei die Monte Carlo Simulation selbst als Anpassungstest diente.
Durch 99 Simulationen der vorgegebenen Modellverteilung (Poisson-Verteilung) bei jeder auftretenden Punktdichte bis zu 71 Punkten/Auswertungsfläche wurde bei den vorliegenden Analysen der Bereich bestimmt, innerhalb dessen jede Verteilung als zufällig anzusehen war. Mit Hilfe der Simulationen konnte die "Güte der Anpassung" einer empirischen, kumulativen Dichteverteilung an das gegebene Modell getestet werden.
RIPLEY selbst (1977) ordnete die empirischen Daten ein, indem er die kumulative Dichtefunktion $\hat{K}$ der Daten, K des gegebenen Modells (Poisson-Verteilung = πt^2) und $\hat{K}$ der Simulationen im Bereich der interessierenden Abstände betrachtete und ab-

schätzte, ob die empirischen Daten innerhalb der simulierten Hüllkurven lagen.

Für die Interpretation der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung wurde diese Kurvenbeurteilung für die als $\sqrt{\frac{\hat{K}(t)}{\pi}}$ dargestellten Verteilungen übernommen. Diese von BESAG (Discussion on Dr. Ripleys Paper, 1977) vorgeschlagene Modifikation führte zur linearen Darstellung des Poisson-Modells, was die Beurteilung möglicher Abweichungen der empirischen von der theoretischen Verteilung erleichterte.

Allerdings geht aus den Darstellungen der mittels Monte Carlo Simulation ermittelten Grenzen der theoretischen Verteilungsfunktionen hervor, daß bei den artifiziellen Daten Abweichungen von der Linearität vorkommen, deren Ursache in der Güte des verwendeten Zufallsgenerators zu suchen ist. Um dadurch hervorgerufene Fehler in der Kurveninterpretation zu vermeiden und eine objektive Beurteilung zu gewährleisten, wurden empirische Abstandsverteilungen nur dann nicht als zufällig verteilt angesehen, wenn sie eine der beiden Geraden überschritten, die die über alle Simulationen gemittelte obere oder untere Grenze beschreiben.

Grundsätzlich sollte aber berücksichtigt werden, daß räumliche Muster selbst mit dem Verfahren von Ripley (1977) nicht einfach zu studieren sind. So wurde anhand von Modellverteilungen versucht, die Aussagefähigkeit und Empfindlichkeit der Abstandsmethode bezüglich der vorgestellten Fragestellung der Verteilung von Insulin-Rezeptor-Komplexen auf der Oberfläche gespreiteter Monozyten abzuschätzen.

Die limitierte Datenmenge erwies sich bei der Anwendung der Abstandsmethode als wenig kritisch. Nur bei sehr kleinen Punktdichten (<15 Punkte) wurde die Schwankungsbreite der Simulationen um die theoretische Kurve so groß, daß zuverlässige Aussagen über Abweichungen von einer zufälligen Verteilung nicht mehr getroffen werden konnten.

Die Silberkorndichten der meisten in die Verteilungsanalyse eingesetzten Monozyten lag bei 30-60 Silberkörnern pro Zellhälfte. In diesem Bereich beschreiben die jeweiligen Simulati-

onen ein eng um die theoretische Funktion begrenztes Gebiet, sodaß bei Abweichungen der empirischen Verteilungen von der Zufälligkeit nicht nur das Vorliegen von Regelmäßigkeit (vergl. Modell IV.28., Seite 147) oder typischen "clustern" (vergl. Modell IV.29.a, Seite 150) deutlich zu erkennen sein sollte, sondern auch weniger augenfällige segregierte Verteilungen (vergl. Modell IV.29.b, Seite 150 und IV.30.a und b, Seite 153) aufgedeckt würden.
Darüberhinaus ermöglichte die Abstandsmethode eine vom biologischen Gesichtspunkt wesentliche Differenzierung innerhalb der segregierten Verteilungen. Empirische, kumulative Dichteverteilungen, die eine Anhäufung sehr kleiner Abstände aufweisen, und somit einem Verteilungsmuster entsprachen, wie es bei Molekülaggregaten zu erwarten wäre, (vergl. "cluster" Modelle IV.29.-32., Seite 150, 153-155), unterschieden sich deutlich von kumulativen Dichteverteilungen, die das Vorliegen von großflächigen Konzentrationsunterschieden reflektieren (vergl. "Domänen unterschiedlicher Dichte" Modell IV.34. & 35., Seite 159, 160).
Anhand der Modelle, bei denen die Abstände oder die Anzahl der Punkte innerhalb eines "clusters", bzw. die Anzahl an "clustern" insgesamt verändert wurde, erwies sich, daß mit der Abstandsmethode unter den gewählten Bedingungen mehrere "cluster" in jedem Fall und ein einzelnes "cluster" in Abhängigkeit von der Gesamtpunktzahl und ihrem Anteil an dieser Punktdichte erfaßt werden.
Die Empfindlichkeit der Abstandsmethode nahm mit abnehmender Punktdichte ab, es war aber anhand von Modellen möglich, Grenzwerte für die jeweiligen Empfindlichkeitsbereiche zu definieren. So war es bei etwa 50 Punkten/Auswertungsfläche möglich, ein einzelnes "cluster" gerade noch zu erkennen, wenn es etwa 10% der Gesamtpunktdichte ausmachte. Im Bereich von 15-30 Punkten mußte ein "cluster" allerdings etwa 20-25% der Gesamtpunkte umfassen, um entdeckt zu werden.
Die deskriptive Beurteilung des empirischen Kurvenverlaufs lieferte somit für den größten Teil der empirischen Daten

ein zuverlässiges Maß, ob die vorliegende Verteilung der Silberkörner bzw. Insulinbindungsstellen einer regelmäßigen, zufälligen oder segregierten Verteilung entspricht und welcher Typ der segregierten Verteilung vorliegt.

Die statistischen Tests c,s und q haben für die hier vorgestellten Verteilungsanalysen hingegen nur geringe Bedeutung. DIGGLE (1979) schlug die statistischen Tests c und s vor, in der Absicht die Analyse der empirischen Verteilung zu objektivieren.
Die statistischen Tests können aber nicht zwischen regelmäßiger und segregierter Verteilung unterscheiden, sodaß ihre Ergebnisse lediglich als Indikator für den Anteil zufälliger Verteilungen anzusehen sind. Sie liefern jedoch keine Information über die für diese Arbeit wesentliche Beteiligung der segregierten Verteilungen.

Da die Einteilung der empirischen, kumulativen Dichteverteilung in regelmäßige, zufällige und segregierte Verteilungsformen jeweils nach den gleichen Kriterien erfolgte, sind unter Berücksichtigung der Empfindlichkeit der Abstandsanalyse die Unterschiede, die sich bezüglich der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auf der Monozytenoberfläche in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen ergaben, als gesichert anzusehen.
Zusammenfassend ließ sich die mit der Abstandsmethode bestimmte Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auf der Oberfläche "flacher" gespreiteter Monozyten wie folgt beschreiben:

1. Bei allen gewählten Bedingungen erwies sich der überwiegende Teil (60-95%) der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen als zufällig.
2. Zwischen den beiden unterschiedlich radioaktiv markierten Insulinen zeichnete sich folgender Unterschied ab:
   a) Die mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin markierten Monozyten wiesen unabhängig von der Inkubationstemperatur

im niedrigen Konzentrationsbereich (10^{-9} mol/l) nur einen geringen Prozentsatz an segregierten Verteilungen (<10%) auf. Im unphysiologisch hohen Insulinkonzentrationsbereich (10^{-8} mol/l) nahm der Anteil an segregierten Verteilungen verglichen mit dem niedrigeren Konzentrationsbereich um das 3-4 fache zu.
Keine der segregierten Verteilungen zeigte den typischen Kurvenverlauf, der auf eine Anhäufung mehrerer "cluster" hinweist. Unabhängig von den Inkubationsbedingungen war der Anteil an "clustern" prinzipiell klein, er umfaßte 3-5% aller vorkommenden Verteilungen. Der Grenzwert der "cluster" Detektion konnte in Abhängigkeit von der Größe des autoradiographischen Signals dort angenommen werden, wo etwa 10-20% aller Elemente ein "cluster" bilden.
Der bei hoher Insulinkonzentration größere Anteil an segregierten Verteilungen war auf eine Zunahme des Verteilungstyps der "Domänen unterschiedlicher Dichte" zurückzuführen.

b) Die bei 15 und 25°C und mit niedrigeren Konzentrationen an RANDOM-markiertem Insulin inkubierten Monozyten zeigten bereits zu 30% segregierte Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen. Im Gegensatz zu den mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin markierten Zellen war jedoch zumindest bei 15°C keine weitere Zunahme dieser Verteilungen im unphysiologisch hohen Konzentrationsbereich (10^{-8} mol/l) zu beobachten. Etwa die Hälfte der segregierten Verteilungen bestand aus "clustern".

Nicht nur der geringe Anteil an segregierten Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen, sondern auch die nie auftretende Kurvenform, die beim Vorliegen mehrerer "cluster" typisch wäre, stand in deutlichem Widerspruch zu den Beobachtungen von SCHLESSINGER und seinen Mitarbeitern (SCHLESSINGER et al. 1978, MAXFIELD et al. 1978, SCHLESSINGER et.al. 1980). Sie fanden bei 3T3-Fibroblasten nach einer Inkubation bei 23 und 37°C auf allen Zellen "patches" von Insulin-Rezeptor-Komplexen

(SCHLESSINGER et al. 1978). Bei 60% der IM9-Lymphozyten traten nach einer Inkubation von 37°C Insulin-Rezeptor-Komplex Aggregate in Form von "caps" auf; die restlichen Zellen zeigten zum größten Teil "patches" und nur einige diffuse Verteilungen (SCHLESSINGER et al. 1980). Ein überwiegend diffuses Fluoreszenzsignal, das auf eine zufällige Verteilung von Hormon-Rezeptor-Komplexen schließen ließ, wurde nur bei Inkubationstemperaturen von 4°C oder vorfixierten Zellen beobachtet (SCHLESSINGER et al. 1978).

Die beim Monozyten vorliegenden, überwiegend zufälligen Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen entsprechen eher den von JARETT und Mitarbeitern veröffentlichten Befunden (JARETT und SMITH 1977, JARETT et al. 1980, NELSON et al. 1978, GERSHON et al. 1981, LYEN et al. 1983). Hier war es bei keinem der untersuchten Zellsysteme möglich, eine insulininduzierte Aggregation der Hormon-Rezeptor-Komplexe nachzuweisen, es fanden sich aber gewebespezifische Unterschiede in der Organisation der Rezeptoren in der Membran. Während mit monomerem Ferritin-Insulin markierte Rezeptoren in der Leberplasmamembran als einzelne Komplexe nachgewiesen wurden (JARETT und SMITH 1977, JARETT et al. 1980), lagen sie in Adipozyten- und Placentamembranen als Gruppen von 2-6 Rezeptoren vor, wobei eine Vorfixierung das Verteilungsmuster nicht veränderte (NELSON et al. 1978, JARETT et al. 1980, GERSHON et al. 1981).

Von der Arbeitsgruppe um JARETT wurde neben der rein visuellen Beschreibung der Ferritin-Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auch eine statistische Methode eingesetzt (GERSHON et al. 1979), die ebenfalls die Dichteverteilung der Nachbarn um einen Partikel auf Zufälligkeit prüft, um das Verteilungsmuster zu quantifizieren (GERSHON et al. 1981).

Durch die von JARETT und Mitarbeitern beschriebenen Befunde und die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Verteilungsmuster der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung wird die von JEFFREY (1982) postulierte Hypothese, daß der ubiquitäre Mechanismus der Insulinwirkung in der ligandeninduzierten Aggregation der Rezeptoren zu suchen sei, in Frage gestellt.

Da das statistische Analyseverfahren eine zuverlässige Beurteilung des Verteilungsmusters auf Monozyten erlaubt, sollten sich die beschriebenen diskrepanten Befunde auf zellspezifische Unterschiede oder mögliche experimentelle Artefakte zurückführen lassen.
Die vorgestellten Diskrepanzen erfordern eine Diskussion der verwendeten Tracer, der damit verbundenen Darstellungsmethoden sowie der verwendeten Untersuchungsobjekte.
Zunächst soll der Einfluß des Tracers auf die Verteilung der Insulinbindungsstellen untersucht werden.

DER EINFLUß DES TRACERS AUF DIE INSULINBINDUNG UND DIE VERTEILUNG DER BESETZTEN REZEPTOREN IN DER PLASMAMEMBRAN

Der Tracer wird vor allem durch seine Bindungsaffinität K_a, den mit ihm bestimmbaren Rezeptorbesatz R_0, das Ausmaß der unspezifischen Bindung und die biologische Aktivität charakterisiert. Das verwendete 125I-Insulin soll daher in Zusammenhang mit den anderen zum Nachweis von Verteilungsmustern eingesetzten Tracern gestellt werden.
Für die von der Arbeitsgruppe um SCHLESSINGER durchgeführten Experimente wurden zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Insuline verwendet. Zum einen wurde ein Kopplungsprodukt aus einem mit 7-8 Rhodaminmolekülen markierten α-Lactalbumin und Insulin, zum anderen wurde Rhodamin-B29-Insulin eingesetzt. Beim Rhodamin-B29-Insulins lag, verglichen mit nativem Insulin, die Bindungsaffinität bei 80% und die biologische Aktivität bei 75%, während das Kopplungsprodukt nur noch etwa 8% der Bindungs- und 1% der biologischen Aktivität des nativen Insulins aufwies (SHECHTER et al. 1978). Die unspezifische Bindung dieser Tracer lag bei 30-40%. Der Verteilungsnachweis wurde bei fast allen Studien im Konzentrationsbereich nahe 10^{-8} mol/l durchgeführt, da vor allem beim Rhodamin-B29-Insulin nur in diesem Bereich eine nachweisbare Markierung der

Zellen erreicht wurde.
Monomeres Ferritin-Insulin weist offensichtlich eine mit dem nativen Insulin vergleichbare Bindungs- und biologische Aktivität auf, die unspezifische Bindung erscheint vernachlässigbar gering (SMITH und JARETT 1982).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedlich markierte 125I-Insuline verwendet; zum einen MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin, von dem bekannt ist, daß es in seiner Bindungs- und biologischen Aktivität dem nativen Insulin entspricht (GLIEMANN et al. 1979) und zum anderen ein RANDOM-jodiertes Insulin, das bezüglich der Position des Jodatoms nicht definiert war.

Die schlechtere Tracerqualität des RANDOM-markierten Insulins zeigte sich bereits bei der Bestimmung der Bindungsaffinität K_a. Im Vergleich zum MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin zeigte das heterogene RANDOM-markierte Produkt eine Abnahme der Affinitätskonstanten K_a um etwa 40%. Während bei der Verwendung der Monozyten als Bindungssystem mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin eine mittlere Affinitätskonstante von $3,49*10^9$ l/mol erzielt wurde, lag die mittlere Affinitätskonstante des RANDOM-markierten Insulins bei $1,86*10^9$ l/mol (vergl. Kapitel IV.2.3., Seite 63).
Eine ähnliche Tendenz bezüglich der Bindungseigenschaften von MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin und einem unter ähnlichen Bedingungen jodierten RANDOM-markierten Insulin wurde für die Insulinbindung an menschlichen Erythrozyten gezeigt. Die Autoren beschrieben neben einer allerdings verglichen mit den Monozyten weniger gravierenden Zunahme der Affinitätskonstanten K_a auch einen um 35% niedrigeren Rezeptorbesatz R_0 bei der Markierung mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin (HEPP et al. 1983).

Auch bei Monozyten wurde ein etwas niedrigerer Rezeptorbesatz R_0 bei der Verwendung von MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin bestimmt; allerdings läßt sich die Ursache dieser Abnahme nicht mit Sicherheit angeben. Die leicht unterschiedliche pH-Abhängig-

keit der beiden Tracer könnte den Schluß zulassen, daß bei pH 7,8 mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin die maximale Bindungskapazität noch nicht erreicht wurde.

Weitere Indizien für die schlechtere Qualität des RANDOM-markierten Insulins bildete auch die im Vergleich zum MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin im Bereich hoher Insulinkonzentrationen höhere unspezifische Bindung (vergl. Tabelle IV.2., Seite 71) und der größere Anteil an nicht TCA-fällbaren Abbauprodukten (vergl. Kapitel IV.2.6., Seite 74).
Verglichen mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin zeigte RANDOM-markiertes Insulin außerdem eine erhöhte unspezifische Bindung bei der Verwendung der Ölzentrifugation als Trenntechnik (vergl. Abb.IV.7., Seite 69). Da, wie in der Diplomarbeit (GIESEN 1981) beschrieben, die hohe unspezifische Bindung bei dieser Trenntechnik vor allem durch nicht gebundenes 125I-Insulin verursacht wurde, das mit der Hydrathülle der Zellen ins Pellet verschleppt wurde, kann der erhöhte Mitreißeffekt als Indiz dafür angesehen werden, daß sich RANDOM-markiertes Insulin bei der Abtrennung des freien Insulins im Ölgradienten prinzipiell anders verhält als MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin.

Die beiden Tracer unterscheiden sich auch bezüglich ihrer pH-Abhängigkeit. So zeigte die spezifische Insulinbindung beim RANDOM-markierten Insulin in Abhängigkeit vom pH-Wert eine bereits von DE MEYTS (1976) und WAELBROECK (1982) für ein ähnlich jodiertes Produkt beschriebene, annähernd glockenförmige Kurve. Die beim MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin zu beobachtende verglichen mit dem RANDOM-markierten Tracer nur geringe Abnahme der Insulinbindung mit steigendem pH-Wert (pH 8,0-9,0) entsprach hingegen den ebenfalls mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin erhobenen Befunden an Herzmuskelzellmembranen (HAUCH 1985). Die im Rahmen der vorgestellten Arbeit bzw. in der Literatur vorliegenden Befunde weisen zwar auf eine je nach Isomerengemisch unterschiedliche pH-Abhängigkeit hin, da aber bisher die einzelnen 125I-Isomere nicht bezüglich ihrer pH-

Abhängigkeit getestet wurden, ist eine Interpretation dieser Befunde nicht möglich.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete RANDOM-markierte Insulin wurde bezüglich seiner Zusammensetzung nicht analysiert; daher können nur Hinweise aus der Literatur zu Spekulationen über seine vermutliche Zusammensetzung verwendet werden. Im allgemeinen wird bei der verwendeten Jodierungsmethode (Chloramin-T nach HUNTER und GREENWOOD 1962) angenommen, daß zwischen 70 und 90% der Radioaktivität in Tyrosin A14 und der Rest vor allem in Tyrosin A19 eingebaut wird (JØRGENSEN und LARSEN 1980, LINDE et al. 1981, GLIEMANN et al. 1981). Es ist allerdings bekannt, daß die Jodierungsbedingungen auf die Zusammensetzung des Isomerengemischs einen gravierenden Einfluß ausüben (BIEHLER und MORRIS 1972, JØRGENSEN und LARSEN 1980, LINDE et al. 1981). Aus dem von Herrn Dr. H.-J. Bubenzer freundlicherweise zur Verfügung gestellten Chromatogramm der HPLC-Auftrennung eines ähnlich jodierten Insulingemischs (Abb.IV.1., Seite 54) geht hervor, daß zumindest unter diesen Jodierungsbedingungen offenbar ein wesentlich geringerer Teil an MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin (~24%) entsteht und die Menge an MONO-125I-(TYR-A19)-Derivaten (~19%) in einer ähnlichen Größenordnung liegt.
Es ist bekannt, daß der Tyrosinrest in Position A19 in der Rezeptor-Bindungsregion liegt (PULLEN et al. 1976). Eine Modifizierung dieses Aminosäurerestes durch Einführung eines Jodatoms könnte demnach dazu führen, daß die Bindungsaffinität und die biologische Aktivität des Tracers reduziert werden. So wurde beschrieben, daß die Verwendung eines homogenen 125I-(TYR-A19)-Insulins bei Rattenadipozyten Bindungsaffinitäten von nur noch 50-65% verglichen mit nativem Insulin ergaben (GLIEMANN et al. 1979) und SONNE und Mitarbeiter (1983) zeigten, daß in Abhängigkeit vom verwendeten Zellsystem die Bindungsaffinitäten des 125I-(TYR-A19)-Produkts zwischen 65 und 90% der Bindungsaffinitäten eines 125I-(TYR-A14)-Insulins aufwiesen.

Demnach könnte bereits ein geringer Anteil an A19-jodiertem Insulin beim RANDOM-markierten Insulin zu einer Verschlechterung der Bindungseigenschaften führen.
Eine weitere Komplikation für die Interpretation der Bindungsdaten ergibt sich daraus, daß bei der Verwendung heterogener Jodierungsprodukte mit hoher Wahrscheinlichkeit auch Dijod-Produkte vorliegen.
Der Anteil an dijodierten Produkten wächst mit zunehmendem Grad der Jodierung (GARRATT et al. 1972, HAMLIN und ARQUILLA 1974, PEREZ MACEDA et al. 1982). So wiesen LINDE und ihre Mitarbeiter (1981) darauf hin, daß bei heterogenen Präparationen mit einem Jodierungsgrad von 0,3-0,8 Mol 125I pro Mol Insulin mit 15-40% dijodiertem Insulin zu rechnen sei.
Für die lichtmikroskopische Autoradiographie wurden nur Tracer verwendet, deren spezifische Aktivitäten nahe der theoretisch möglichen Grenze von 370 µCi/µg lag, die Jodierung erfolgte daher im Verhältnis von einem Mol 125I zu einem Mol Insulin. Dijod-Derivate können die Qualität des Tracers dadurch vermindern, daß diese Produkte Jodid freisetzen oder Polymere mit geringer spezifischer aber großer unspezifischer Bindung bilden (PEREZ MACEDA et al. 1982).
Zwei Indizien sprechen für das Vorliegen von Dijodprodukten beim RANDOM-markierten Insulin: Der bereits kurz nach der Jodierung hohe Anteil an nicht TCA-fällbaren Abbauprodukten (vergl. Kapitel IV.2.6., Seite 74) und der Anstieg der unspezifischen Bindung bei hohen Konzentrationen (vergl. Tabelle IV.2., Seite 71). Da aber keine chromatographischen Analysen der verwendeten Insuline durchgeführt wurden, ist der tatsächliche Anteil an Dijodprodukten nicht bekannt.

Die schlechtere Tracerqualität des RANDOM-markierten Insulins kommt demnach bereits bei der Bestimmung der Bindungseigenschaften deutlich zum Ausdruck. Ein verändertes Bindungsverhalten könnte aber auch die Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung stören. Es liegt daher nahe, die Ursache des im Vergleich zum MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin schon bei niedriger Inkuba-

tionstemperatur (15°C) und physiologischer Hormonkonzentration größeren Anteils an segregierten Verteilungen (~30%) in der schlechten Qualität des RANDOM-markierten Insulins zu suchen.

Aus dem Vergleich zwischen MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin und RANDOM-markiertem Insulin, das ein dem nativen Insulin ebenfalls noch recht ähnliches Derivat darstellt, geht hervor, daß auch eine geringfügige Modifizierung des nativen Insulins Folgen für die biologischen Eigenschaften des Tracers mit sich bringt. Wenn aber bereits die Jodierung zu Veränderungen des Bindungsverhaltens führt, ist vorstellbar, daß die Einführung von Makromolekülen wie bei der Kopplung von Insulin an Ferritin-, Gold-BSA- oder Rhodamin-α-Lactalbumin, noch stärkere Beeinträchtigungen der Tracereigenschaften zu erwarten sind. Auch aufgrund möglicher sterischer Beeinflussung erscheint es fraglich, ob diese Tracer ein getreues Abbild des Bindungsverhaltens eines nativen Insulins wiedergeben.
Auch die mögliche Aggregatbildung großer Insulinkonjugate wie Ferritin-, Gold-BSA- oder Rhodamin-α-Lactalbumin-Insulin wurde bisher kaum untersucht. Während das native Insulin nur bei Insulinkonzentrationen $>10^{-6}$ mol/l Dimere in größerem Umfang bilden sollte (K_a = 2,2- 7,5*10^5 M^{-1}, BLUNDELL et al. 1972, POCKER und BISWAS 1981), ist eine Bildung von Di- oder Oligomeren Kopplungsprodukten vor allem bei hohen Tracerkonzentrationen ($\geq 10^{-8}$ mol/l) wie sie von SCHLESSINGER und seinen Mitarbeitern eingesetzt wurden, nicht auszuschließen. Solche Liganden wären dann durch die mögliche Bi- oder Multivalenz in der Lage artifizielle Aggregate hervorzurufen, die lediglich auf dem Charakter des verwendeten Liganden beruhen.
Hohe Tracerkonzentrationen können aber selbst bei einem Tracer zufriedenstellender Qualität das Verteilungsmuster der Insulinbindungstellen aufgrund zunehmender unspezifischer Bindung beeinflussen. Während die unspezifische Bindung mit 2-4% im niedrigeren Konzentrationsbereich vernachlässigbar war, fanden sich bei einer Konzentration von 10^{-8} mol MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin/l bei 15 und 25°C 10% und bei 37°C etwa 20% unspezifi-

sche Bindung (vergl. Kapitel IV.4.1., Seite 95). Es liegt nahe den im hohen Insulinkonzentrationsbereich zunehmenden Anteil an segregierten Verteilungen in Form von "Domänen unterschiedlicher Dichte" auf unspezifische Effekte zurückzuführen. Wenn aber bereits 10-20% unspezifische Bindung einen Einfluß auf das Verteilungsmuster haben, ist denkbar, daß beim Einsatz der Fluoreszenzinsuline, bei denen 30-40% unspezifische Bindung vorlagen (SCHLESSINGER et al. 1978 & 1980), spezifische Verteilungssignale zu einem nicht unbedeutenden Teil von unspezifischen Effekten überlagert werden.

DIE AUSWAHL DER QUANTITATIVEN LICHTMIKROSKOPISCHEN AUTORADIOGRAPHIE ALS DETEKTIONSMETHODE: DIE MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER QUANTIFIZIERUNG UND LOKALISATION VON INSULIN-REZEPTOR-KOMPLEXEN AUF DER MONOZYTENOBERFLÄCHE

Die zum Nachweis der Verteilung verwendete Detektionsmethode sollte hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit und Auflösung überprüft werden.
Die von SCHLESSINGER (1980) verwendete Methode zum Nachweis von fluoreszierenden Insulinderivaten machte den Einsatz einer bildverstärkenden Videokamera im Fluoreszenzmikroskop nötig, damit geringe Lichtintensitäten noch entdeckt werden konnten (SCHLESSINGER et al. 1978). Trotzdem reichte die Empfindlichkeit der Methode nicht aus, um beim Rhodamin-B29-Insulin diffuse Verteilungen nachzuweisen, aber auch bei der Verwendung des stärker fluoreszierenden Rhodamin-α-Lactalbumin-Insulin wurden größtenteils hohe Tracerkonzentrationen von 50 µg/ml ($0{,}9 * 10^{-8}$ mol/l) vorgegeben (SHECHTER et al. 1978, SCHLESSINGER et al. 1978). Weder das diffuse, noch das in "clustern", "patches" oder "caps" auftretende Fluoreszenzsignal konnte quantifiziert werden. SCHLESSINGER (1980) selbst vermutet, daß unsichtbare Mikro-"cluster" als Folge der Insulinbindung entstehen, und daß sich im Anschluß daran sichtbare "patches"

aus etwa hundert besetzten Rezeptoren bilden.
Der Einsatz der Elektronenmikroskopie, die zum Nachweis von Ferritin- und Gold-Insulin dient, bietet grundsätzlich im Vergleich zur Lichtmikroskopie den Vorteil des wesentlich größeren Auflösungsvermögens. So wurde Ferritin-Insulin auch bei niedrigeren Konzentrationen (10^{-9} mol/l) verwendet (LYEN et al. 1983); allerdings wurde die Darstellung der Ferritin-Konjugate an elektronenmikroskopischen Schnittpräparaten erstellt (NELSON et al. 1978, JARETT et al. 1980).
Limitierend wirkte sich bei den elektronenmikroskopischen Studien bisher vor allem die Tracerqualität, z.B. die potentielle Multivalenz des Gold-BSA-Insulins, aus (ACKERMANN und WOLKEN 1981). Bei den goldmarkierten Insulinen zeichnen sich allerdings neue Nachweismöglichkeiten ab. Es kann mittlerweile davon ausgegangen werden, daß Biotinyl-Insulin bezüglich seiner Bindungseigenschaften dem nativen Insulin vergleichbar ist. Nach einer Inkubation mit Biotinyl-Insulin und Abtrennung des nicht gebundenen Tracers soll eine Verknüpfung mit an Avidin oder Streptavidin gekoppeltem kolloidalem Gold auch im bereits fixierten Zustand möglich sein (NIR et al. 1984), sodaß Nachteile wie sie beim Gold-BSA-Insulin zum Tragen kommen, künftig vermeidbar sein sollten.

Der Einsatz der lichtmikroskopischen Autoradiographie bietet den Vorteil, daß der verwendete Tracer, das 125I-Insulin, nicht nur dem autoradiographischen Nachweis dient, sondern darüberhinaus den am häufigsten in Bindungsstudien eingesetzten Tracer darstellt. Die Bestimmung der Insulinbindung erfolgt je nach Methode durch andere Meßprinzipien.
Die quantitative lichtmikroskopische Autoradiographie nutzt die beim Zerfall des 125I-Isotops emittierten Auger- und Interkonversionselektronen (FORBERG 1964, CHARLTON und BOOZ 1981), die die Anzahl und den Ort markierter Moleküle durch lokale Reduktionen in der darüberliegenden Photoschicht anzeigen. Dementsprechend ist es mit dieser Methode unter Beachtung der Präparatgeometrie möglich, die Insulinbindung an der

Einzelzelle zu bestimmen.

Die gebräuchlichere Verwendung des 125I-Isotops in konventionellen Bindungsstudien beruht auf dem Nachweis der ebenfalls emittierten γ-Strahlung. Nach Inkubation und Abtrennung des nicht gebundenen Tracers wird die Radioaktivität eines Aliquots des eingesetzten Materials im γ-counter gemessen.
Eine Kombination beider Bestimmungsmethoden kann unter sorgfältiger Abwägung möglicher Fehlerquellen zuverlässige Aussagen über die aktuelle Insulinbindung liefern.

Die Bestimmung der Insulinbindung, die sich aus der Radioaktivitätsmessung einer Zellsuspension im γ-counter ergibt, birgt prinzipiell drei Fehlerquellen: Die Messung der radioaktiven Zerfälle in Gerät, die Volumenbestimmung des eingesetzten Aliquots und die Bestimmung der darin enthaltenen Anzahl an Zellen.
Neben den aufgezählten Fehlern können die Ergebnisse auch noch durch andere Faktoren beeinflußt werden:
In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Anwendung eines geeigneten Systems zur Abtrennung des nicht gebundenen Liganden im Anschluß an die Inkubation eine wesentliche Rolle bei der Bestimmung der Insulinbindung spielt (vergl. Kapitel IV.2.3., Seite 67 und IV.2.4., Seite 69).
Die Verwendung von Mischpopulationen, bei denen sich die Bindungskapazitäten der Einzelfraktionen, wie bei den mononukleären Leukozyten, unterscheiden, kann zu weiteren Fehlerquellen in der Interpretation der durch Radioaktivitätsmessung im γ-counter bestimmten Bindungsdaten führen.
Anhand der autoradiographischen Ergebnisse (Kapitel IV.4.1., Seite 94) zeigt sich, daß die Anzahl gebundener Insulinmoleküle im Ansatz der Totalbindung auf dem einzelnen Lymphozyten mit 20-50 gering ist und zu einem bedeutenden Anteil aus nur unspezifisch adsorbiertem Liganden besteht. Durch den hohen Anteil an Lymphozyten in der Mischpopulation (80-90%) kann ihre Beteiligung an der durch Radioaktivitätsmessung an der

Mischpopulation bestimmten Bindung bis zu 20% der Total- und bis zu 80% der unspezifischen Bindung ausmachen (vergl. Tabelle IV.8., Seite 103). Die allgemein übliche Normierung der gesamten im γ-counter bestimmten Insulinbindung auf die Monozyten führt demnach zu einer Überschätzung der Bindungsstellen auf den Monozyten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher zur Erstellung der Bilanz der Bindungsanteil der Monozyten am im γ-counter bestimmten Signal durch einen aus den jeweiligen Autoradiogrammen ermittelten Faktor korrigiert.
Auch von einer anderen Arbeitsgruppe (BECK-NIELSEN et al. 1977) wurde eine Korrektur der Insulinbindung vorgenommen. Hierbei wurde die Bindungsbeteiligung nach der Anreicherung der jeweiligen Zellfraktion bestimmt. Sie führten einen Korrekturfaktor ein, wobei dem Lymphozyten eine Bindungsbeteiligung von 20% unabhängig von Total- oder unspezifischer Bindung zugeschrieben wurde.

Unter den gewählten Bedingungen erlaubte die lichtmikroskopische Autoradiographie anhand von Zellausstrich- und Semidünnschnittpräparaten eine annähernde Differenzierung zwischen Insulinbindungsstellen auf der Zelloberfläche und dem Anteil an internalisiertem Insulin. Um eine Quantifizierung und Lokalisation von 125I-Insulinmolekülen am Zellausstrichpräparat oder im Semidünnschnitt vornehmen zu können, muß neben den durch Testpräparate bestimmten autoradiographischen Empfindlichkeiten (SEMMLER und JUNGER 1986) auch das jeweilige autoradiographische Auflösungsvermögen bekannt sein.
Für Semidünnschnitte ist die charakteristische Größe des Auflösungsvermögens, die Halbwertsdistanz HD bestimmbar; sie liegt bei 0,5 µm dicken Schnitten bei 0,25 µm (WILLIAMS et al. 1983). Dieses autoradiographische Auflösungsvermögen geht in die statistische Auswertung der Semidünnschnitt-Autoradiogramme ein (DOWNS und WILLIAMS 1978), sodaß eine Lokalisation der im Autoradiogramm vorliegenden Silberkörner bzw. 125I-Insulinmoleküle möglich war (vergl. Kapitel III.4.2., Seite 44 und Kapitel IV.4.4.2., Seite 124). So ließ sich anhand dieser

Autoradiogramme der Anteil an internalisiertem Tracer abschätzen. Er lag bei etwa 20% im niedrigeren Insulinkonzentrationsbereich, stieg aber bei einer hohen Insulinkonzentration (10^{-8} mol/l) auf über 30% an (vergl. Tabelle IV.15.,Seite 132). Wider Erwarten ließ sich kein Einfluß der Inkubationstemperatur auf das Ausmaß der Internalisierung feststellen. Bereits bei einer Inkubationstemperatur von 15°C lag der Anteil an internalisiertem Insulin bei 20%. Allerdings wurde beschrieben, daß zwar bei 4°C keine Endozytose zu beobachten ist, aber schon bei Inkubationstemperaturen > 10°C deutliche Endozytoseraten nachweisbar sind (STEINMAN et al. 1983). Trotzdem sollte zumindest bei der Stoffwechseltemperatur von 37°C mit einer Steigerung der Endozytoseleistung zu rechnen sein. Der ausstehende Nachweis einer erhöhten Internalisierungsrate könnte darauf zurückzuführen sein, daß gleichzeitig auch eine erhöhte Abbaurate vorliegt, sodaß internalisiertes Insulin rascher als bei 15°C abgebaut und die Degradationsprodukte schneller wieder ausgeschleust werden. Ein Indiz hierfür könnten die bei einer Inkubationstemperatur von 37°C bestimmten, erhöhten Mengen an nicht TCA-fällbaren Abbauprodukten bilden (vergl. Kapitel IV.2.6., Seite 74). Da aber im Rahmen dieser Arbeit keine zeitabhängigen Internalisierungsstudien durchgeführt wurden, sind zuverlässige Aussagen über das Zusammenspiel der beiden gegenläufigen Prozesse, Internalisierung und Ausschleusen der abgebauten Produkte, nicht möglich.

Bei Zellausstrichpräparaten wird die Lokalisation der Insulinbindungsstellen, sofern diese tatsächlich in der Plasmamembran vorliegen, durch das "laterale" Auflösungsvermögen wenig beeinflußt. Als Maß für das "laterale" Auflösungsvermögen wurde - der geringen Dicke der Plasmamembran Rechnung tragend - das Auflösungsvermögen elektronenmikroskopischer Autoradiogramme von Ultradünnschnitten (50 nm) bei gleichen autoradiographischen Bedingungen zugrundegelegt; die dort bestimmte Halbwertsdistanz betrug 0,09 µm (SALPETER et al. 1978).
Die Lokalisation der Insulinbindungsstellen in der Plasmamembran wird aber durch das "vertikale" Auflösungsvermögen einge-

schränkt. Bei Autoradiogrammen von Zellausstrichpräparaten muß grundsätzlich der Signalanteil, der potentiell auch aus dem Zellinnern zum Gesamtsignal beitragen kann, bestimmt werden. Während der auf niederenergetische (3-4 keV) Elektronen zurückzuführende Signalanteil im Zellausstrichpräparat infolge der geringen Reichweite dieser Elektronen (200-400 nm) nur von Zerfällen in der Plasmamembran verursacht werden kann, erreichen die hochenergetischen (23-35 keV) Elektronen mit einer mittleren Reichweite von 15 µm von allen Teile der Zelle aus die Photoschicht. Der Anteil der auf hochenergetische Elektronen zurückzuführenden Silberkörner am Gesamtsignal ließ sich bestimmen und betrug 10-16% (Tabelle IV.10., Seite 113). Somit war durch die Subtraktion dieses Signalanteils vom Gesamtsignal die Quantifizierung der plasmamembranständigen Insulinbindungsstellen möglich und ihre Lokalisation wurde durch den verhältnismäßig geringen Anteil an Silberkörnern, die keine Ortsinformation liefern, kaum verunschärft (vergl. Kapitel IV.4.3., Seite 110)
Die Lokalisation der Insulinbindungsstellen wurde daher auch durch internalisiertes 125I-Insulin nicht gestört, während bei der Verwendung von Fluoreszenzinsulin auch ein Signal, das nicht mehr auf der Zelloberfläche, sondern bereits im Endozytosevesikel vorlag, deutlich zu erkennen war (SCHLESSINGER et al. 1978).

Die Autoradiographie bietet durch die Kombination der Bestimmung von plasmamembranständigen Insulinbindungstellen und der Abschätzung des internalisierten Anteils an Insulin im Semidünnschnitt die Möglichkeit zu einem Vergleich mit den Angaben über die Insulinbindung, die sich aus der Radioaktivitätsmessung im γ-counter ergeben. So umfaßte der zelloberflächenständige Anteil an gebundenem Insulin im Ansatz der Totalbindung etwa 50% der im γ-counter bestimmten und um den Anteil der Lymphozyten korrigierten Insulinbindung (vergl. Tabelle IV.11., Seite 115). Wenn zum plasmamembranständigen Anteil an Insulinmolekülen der etwa 20-30% umfassende Anteil an in-

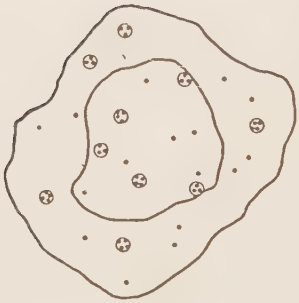
ternalisiertem Insulin addiert wird, so findet sich zwar mittels Autoradiographie verglichen mit der Radioaktivitätsmessung im γ-counter grundsätzlich etwa 20% weniger gebundenes Insulin pro Monozyt, aber unter Berücksichtigung der prinzipiellen Unterschiede und möglichen Fehlerquellen beider Methoden ist die Bilanz zufriedenstellend.

Anhand der autoradiographischen Empfindlichkeit und Auflösung kann abgeschätzt werden, welche Größe ein "cluster" haben muß, damit es auf gespreiteten Monozyten unter den gewählten Bedingungen nachgewiesen werden kann.
Bei den meisten der ausgewerteten Autoradiogramme lag eine Relation zwischen den plasmamembranständigen Insulinbindungsstellen und den sie im Autoradiogramm repräsentierenden Silberkörnern von 3-4 : 1 vor (vergl. Tabelle IV.17., Seite 142). Eine Anhäufung von 5 Punkten innerhalb einer zufälligen Verteilung würde demnach einem "cluster" von 15-20 Insulinrezeptoren entsprechen.
"Cap"-Bildungen, aber auch "cluster"-Bildungen in dem Umfang, wie sie von SCHLESSINGER und Mitarbeitern (1978, 1980) beschrieben wurden, müßten sich beim Monozyten deutlich nachweisen lassen. So bedeckt ein von der Gruppe um SCHLESSINGER (1978) mit Fluoreszenzinsulin markierter "patch" eine Fläche von etwa 5 μm^2 und soll mindestens 50 bis 100 Rezeptoren repräsentieren.
Auf einer solchen Fläche müssen diese 50-100 Rezeptoren unter den gewählten autoradiographischen Bedingungen eine Anhäufung von 15-35 Silberkörnern bilden, die auf der relativ großen Fläche von 5 μm^2 leicht zu erkennen sein sollten.
Für den "cluster"-Nachweis sind aber auch geometrische Faktoren wesentlich.
Ein vermutetes "cluster" kann unter lichtmikroskopischen Bedingungen als eine Punktquelle angesehen werden. Der Durchmesser der Silberkörner im Lichtmikroskop liegt bei der Verwendung der Ilford-L_4 Photoemulsion und Mikrodol-X Entwicklung zwi-

schen 0,2 und 0,4 µm. Wie bereits beschrieben können auch Silberkörner, die auf 125I-Zerfälle in der Plasmamembran zurückzuführen sind, in einer gewissen Distanz zu ihrer Strahlquelle liegen, sodaß auch hier mit einer geringen Streuung der Silberkörner um die Strahlquelle zu rechnen ist.
Wegen der geringen Dicke der Plasmamembran wurde als Näherungswert die Halbwertsdistanz von 0,09 µm, die für das 125I-Isotop im elektronenmikroskopischen Dünnschnitt (Dicke: 50 nm) bei der Verwendung der entsprechenden Photoemulsion und Entwicklung bestimmt wurde, eingesetzt (SALPETER et al. 1978). Außerdem wurde angenommen, daß innerhalb eines Kreises mit einem Radius von 6 Halbwertsdistanzen das entsprechende Silberkorn mit einer Wahrscheinlichkeit von >90% zu finden ist. In einem solchen Kreis lassen sich bei einem mittleren Silberkorndurchmesser von 0,3 µm 5-7 Silberkörner deutlich voneinander unterscheiden. Falls ein "cluster" von Insulin-Rezeptor-Komplexen an einem Punkt der Oberfläche vorliegt, so sollten aufgrund der Streubreite mehrere deutlich zu unterscheidende Silberkörner im einem eng begrenzten Bereich auftreten.

Anhand von zwei autoradiographischen Experimenten wurden "cluster"-Modelle erstellt, bei denen die jeweils vorliegenden autoradiographischen Bedingungen berücksichtigt wurden.
Im Modell V.1. wurde eine autoradiographische Auswertung verwendet, bei der im Mittel 130 Insulin-Rezeptor-Komplexe nach einer Inkubation bei 37°C und 10^{-9} mol Insulin/l auf der der Photoemulsion zugewandten Oberflächenhälfte gespreiteter Monozyten zu finden waren. Durch die lange Expositionszeit von 150 Tagen wurde eine Relation zwischen besetzten Insulinrezeptoren und Silberkörnern von 2,8 : 1 erzielt; demnach fanden sich im Mittel 46 auf niederenergetische Elektronen zurückzuführende Silberkörner auf der Zellhälfte, der Anteil der durch hochenergetische Elektronen verursachten Silberkörner lag mit 6 Silberkörnern bei 12,6%, sodaß jedes 8. Silberkorn keine Ortsinformation beinhaltete.
Bei Modell V.1. wurde angenommen, daß etwa 3/4 der Insulin-

Rezeptor-Komplexe "cluster" zu je 10 Rezeptoren bilden, ein "cluster" sollte also durch 3,5 Silberkörner repräsentiert werden.
Mittels Zufallszahlen wurden 10 Punktquellen, die die "cluster" darstellen sollen, verteilt. Um diese Punktquellen wurden Kreise mit dem Radius von 6HD gezogen, innerhalb dieser Kreise wurden 3-4 Silberkörner (Ø 0,3 µm) eingetragen. Die restlichen 11 Silberkörner der nicht aggregierten Insulin-Rezeptor-Komplexe und die 6 auf hochenergetische Elektronen zurückzuführenden Silberkörner wurden ebenfalls zufällig verteilt.
Mit der Abstandsmethode läßt sich diese "cluster"-Bildung deutlich nachweisen, im Bereich kurzer Objektabstände verläuft die empirische kumulative Dichteverteilung der Abstände oberhalb der Grenze der zufälligen Verteilung.
Das zweite Beispiel, eine Inkubation von 15°C und 10^{-9} mol Insulin/l, geht von einem höheren Oberflächenbesatz an Insulin-Rezeptor-Komplexen (220 Insulinmoleküle/Zellhälfte) aus. Allerdings wird hier nur jeder 5-6 Rezeptor durch ein Silberkorn repräsentiert; der Anteil der durch hochenergetische Elektronen verursachten Silberkörner betrug 12,6%. Im Modell V.2. bilden alle besetzten Rezeptoren "cluster" zu je 15 Insulin-Rezeptor-Komplexen, die durch Gruppen von 2-3 Silberkörner dargestellt werden. Auch hier ist der Nachweis der "cluster"-Bildung eindeutig. Bei den kleinen "cluster"-Größen von 10-15 Rezeptoren, bzw. 3-4 Silberkörnern wird allerdings eine Nachweisgrenze erreicht, wenn die Menge an Insulin-Rezeptor-Komplexen, die "cluster" bilden, bei 20% liegt. In Modell V.3. wurden für dasselbe autoradiographische Experiment wie in Modell V.2. nur drei "cluster" zu je 15 Rezeptoren postuliert, die restlichen 175 Insulinrezeptoren (32 Silberkörner) sollen zufällig verteilt sein. Aus dem Kurvenverlauf der empirischen kumulativen Dichteverteilung der Abstände geht gerade noch hervor, daß eine geringfügige Anhäufung kurzer Abstände vorliegt. Demnach wären unter den gewählten Bedingungen beim Monozyten "cluster"-Bildungen von nur 10-15 Rezeptoren auch dann noch nachweisbar, wenn sie nur einen Teil der Rezeptoren umfassen.



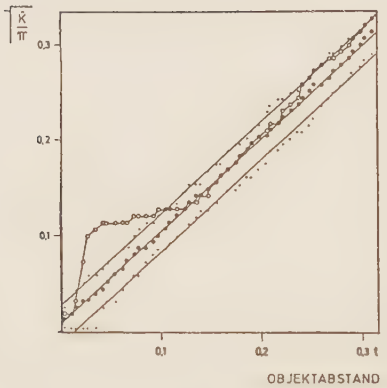


ABB.V.1.

MODELL EINER "CLUSTER"-BILDUNG VON 75% DER BESETZTEN INSULINREZEPTOREN

Dem Modell liegt ein Experiment zugrunde, bei dem die Zellsuspension 1h bei 37°C mit 10^{-9} mol 125I-Insulin/l inkubiert wurde, die Expositionszeit betrug 150 Tage. Es liegt eine Relation zwischen besetzten Insulinrezeptoren (130/ZH) und Silberkörnern von 2,8 : 1 vor. Im Mittel finden sich 46 auf niederenergetische Elektronen zurückzuführende Silberkörner, der Anteil der durch hochenergetische Elektronen verursachten Silberkörner lag bei 12,6%.

Im vorliegenden Modell werden 10 "cluster" zu je 10 Rezeptoren und dementsprechend 3-4 Silberkörnern, die innerhalb eines Kreises mit dem Radius 6 HD liegen, angenommen. Der Verlauf der empirischen, kumulativen Dichteverteilung (O) zeigt das Vorliegen der "cluster" deutlich an.

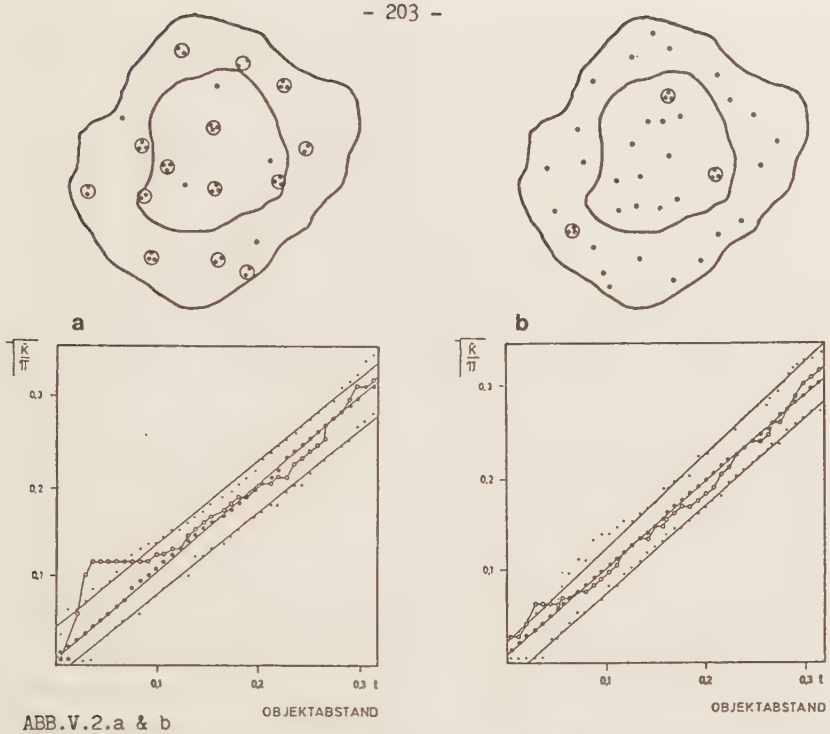


ABB.V.2.a & b

MODELL EINER VOLLSTÄNDIGEN UND EINER NUR 20% DER BESETZTEN REZEPTOREN UMFASSENDEN "CLUSTER"-BILDUNG

Den Modellen liegt ein Experiment zugrunde, bei dem die Zellsuspension 2h bei 15°C mit 10^{-9} mol 125I-Insulin/l inkubiert wurde, die Expositionszeit betrug 50 Tage. Es liegt ein Relation zwischen besetzten Insulinrezeptoren (220/ZH) und Silberkörnern von 5,7 : 1 vor. Im Mittel finden sich 38 auf niederenergetische Elektronen zurückzuführende Silberkörner, der Anteil der durch hochenergetische Elektronen verursachten Silberkörner lag bei 12,6%.

In Modell V.2.a sollen sich alle besetzten Insulinrezeptoren an der "cluster"-Bildung beteiligen und kleine "cluster" von je 15 Insulinrezeptoren, bzw. 2-3 Silberkörnern bilden. Der Verlauf der empirischen, kumulativem Dichteverteilung (○) zeigt das Vorliegen der "cluster" deutlich. In Modell V.2.b bilden nur 20% der besetzten Insulinrezeptoren "cluster". Die empirische, kumulative Dichteverteilung (○) verläuft im Bereich kleiner Abstände geringfügig oberhalb der für eine zufällige Verteilung (●) vorgegebenen Grenze (•).

EINFLÜSSE, DIE DURCH DAS UNTERSUCHUNGSOBJEKT, DEN MONOZYTEN, AUF DIE VERTEILUNG AUSGEÜBT WERDEN

Es besteht die Möglichkeit, daß die zur Verteilungsanalyse von den jeweiligen Arbeitsgruppen verwendeten Zellsysteme das Verteilungsmuster spezifisch beeinflussen.
Die Monozyten stellen als Vorläufer der Makrophagen eine noch nicht endgültig differenzierte Zelle dar, die aber in der Blutzirkulation ähnliche Aufgaben übernimmt, wie der Makrophage im Gewebe, z.B. Phagozytose und anschließende Zerstörung von Mikroorganismen, Sekretion von Mediatoren und Regulatoren bei Entzündungen, Interaktion mit Antigenen und Lymphozyten in der Immunantwort (ACKERMANN und DOUGLAS 1980). Seit den Arbeiten von SCHWARTZ und Mitarbeitern (1975) ist bekannt, daß der Monozyt auch über Insulinrezeptoren verfügt. Die Insulinbindung am Monozyten wurde in den folgenden Jahren von vielen Arbeitsgruppen studiert (DE MEYTS 1976, BAR et al. 1976, DE FRONZO et al. 1978, PEDERSEN und BECK-NIELSEN 1976, BECK-NIELSEN et al. 1976, 1977, 1981, BECK-NIELSEN und PEDERSEN 1979). Insulineffekte, wie der insulinstimulierte Glukosetransport oder die Steigerung der immunologischen Kapazität, wurden allerdings seltener beschrieben (BECK-NIELSEN und PEDERSEN 1979, BECK-NIELSEN et al. 1981).
Die Angaben über den beim Monozyten bestimmten Rezeptorbesatz R_0 und die Affinitätskonstante K_a schwanken außerordentlich (vergl. Tabelle V.1.). Die Variation der Bindungdaten kann auf Unterschieden in den experimentellen Ansätzen, z.B. das verwendete 125I-Insulin betreffend, beruhen; zusätzlich kann eine weitere Ursache für die Streuung in der mathematischen Anpassung der experimentellen Daten liegen. Bei der Bestimmung der Bindungsparameter aus dem Scatchard-Plot (SCATCHARD 1949) können durch die Art der Auftragung (B/F gegen B) große Unsicherheiten entstehen. Die auf der Abszisse aufgetragene Konzentration an gebundenem Liganden (B) unterliegt selbst bei einem konstanten Meßfehler gegen hohe Konzentrationen einer starken Streuung. Falls die graphische

Darstellung nicht linear ist, können auch unkorrekte Extrapolationen des Kurvenverlaufs zu Fehlinterpretationen der Bindungsdaten führen (NØRBY et al. 1980, KLOTZ 1982, FELDMANN 1983, KLOTZ und HUNSTON 1984).
Beim Einsatz numerischer Verfahren, denen mathematische Modelle für die Ligandenbindung zugrunde liegen, kann die Wahl des Auswertungsmodells die Größe der Bindungsparameter beeinflussen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete nicht lineare Regressionsverfahren nach PETERS und PINGOUD (1979 und 1982) vergleicht die gemessenen Bindungsdaten mit der theoretischen Bindungsisotherme.
Mit dem verwendeten Verfahren wird ein häufig über den gemessenen Betrag hinausgehender Anteil an unspezifischer Bindung von der Totalbindung subtrahiert. Dem liegt zugrunde, daß der nicht lineare Scatchard-Plot häufig auf einen zu niedrig bestimmten Wert der unspezifischen Bindung zurückzuführen sein soll, sodaß ein scheinbarer, niederaffiner Bindungsanteil vorgetäuscht wird (PETERS und PINGOUD 1982). Das verwendete Verfahren betont somit den hochaffinen Teil der Bindung.
Während sich nach dem Modell von PETERS und PINGOUD nur eine Klasse von Rezeptoren am Monozyten nachweisen läßt, wurden von allen anderen Arbeitsgruppen zwei Klassen von Rezeptoren, bzw. ein negativ-kooperatives Bindungsverhalten postuliert. Nur bei einer der Bestimmungen wurde A14-markiertes Insulin eingesetzt (BECK-NIELSEN et al. 1981). In diesem Fall wurden zwar auch zwei Rezeptorklassen gefunden, aber die Affinitätskonstante K_a der hochaffinen Klasse stimmte mit der im Rahmen dieser Arbeit an MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin bestimmten Affinitätskonstanten K_a annähernd überein. In dem Fall, wo ein mathematischer Kurvenanpassungsalgorithmus zur Bestimmung der Bindungsparameter verwendet wurde (WHITSON und KAPLAN 1983), lagen zwar auch zwei Rezeptorklassen vor, aber der hochaffine Teil deckte sich in seiner Rezeptorkonzentration R_0 mit den nach dem Verfahren von PETERS und PINGOUD ermittelten Werten. Der in der Tabelle V.1. aufgeführte hohe Rezeptorbesatz R_0 von 10000-20000 Rezeptoren pro Monozyt wurde ausschließlich

TABELLE V.1.

AFFINITÄTSKONSTANTEN K_a UND REZEPTORBESATZ R_0 BEI MONOZYTEN

Arbeitsgruppe	Affinitätskonst. K_a (l/Mol)	Rezeptorkonzentr. R_0 Moleküle/Monozyt	Auswertungsmethode
BECK-NIELSEN et al. (1981)	HA: $4{,}0*10^9$	70000 (HA:700)	Auftragung nach SCATCHARD (1949)
BECK-NIELSEN et al. (1977)	HA: $2{,}2*10^9$	7000	"
BECK-NIELSEN & PEDERSEN (1979)	nicht angegeben	19000	"
BAR et al. (1976)	HA: $1\text{-}2{,}3*10^8$ NA: $2\text{-}4\ *10^7$	22000	"
DE FRONZO et al. (1978)	HA: $3{,}8*10^8$	14500	"
WHITSON & KAPLAN (1983)	HA: $8{,}5*10^8$ NA: $5{,}4*10^6$	1900 96000	nach einem Bindungsmodell berechnet
hier vorgest. Bindungsdaten: RANDOM-mark. Insulin	$1{,}9*10^9$ (einklassig)	2240	nicht lin. Regressionsverfahren nach PETERES und PINGOUD (1979 und 1982)
MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin	$3{,}5*10^9$ (einklassig)	1650	

HA: hochaffine Rezeptorklasse, NA: niederaffine Rezeptorklasse.

aus nicht linearen Auftragungen nach SCATCHARD (1949) entnommen, sodaß die Vermutung naheliegt, daß ein großer Teil der im niederaffinen Teil angenommenen Bindungsstellen auf einer Unterschätzung der jeweiligen unspezifischen Bindung beruhen könnte. Dementsprechend scheint der Monozyt, verglichen mit Zellen aus den Zielgeweben der Insulinwirkung, die wie Hepatozyten auch bei 37°C über etwa 16000 (GAMMELTOFT et al. 1978) oder wie Fettzellen über 11000-50000 Insulinrezeptoren pro Zelle verfügen (GAMMELTOFT und GLIEMANN 1973), mit etwa 1700 Insulinrezeptoren pro Zelle (bei 15°C) bedeutend weniger Rezeptoren aufzuweisen. Allerdings sollte berücksichtigt werden, daß beim Monozyten eine wesentlich kleinere Oberfläche als bei Hepatozyten oder Fettzellen vorliegt. Die Oberfläche des Monozyten kann anhand des "flachen" gespreiteten Monozyten, wo die Plasmamembran vollständig ausgebreitet vorliegen sollte, abgeschätzt werden (vergl. Tabelle IV.4., Seite 82). Wenn sie mit $\sim 600\ \mu m^2$ angenommen wird, so finden sich nach Inkubationen bei 15°C etwa 3 Rezeptoren/μm^2, während bei Hepatozyten ein Rezeptorbesatz von 8-10 und bei Fettzellen von 3-6 Rezeptoren/μm^2 auch noch bei 37°C anzunehmen ist.
Bezüglich der Ausstattung mit Insulinrezeptoren erwies sich die Monozytenpopulation als homogen, die Verteilung der Anzahl an Silberkörnern und somit der Insulinbindungsstellen in der Monozytenfraktion ließ sich durch eine Normalverteilung beschreiben (vergl. Kapitel IV.4.2., Seite 104).

Die Morphologie des verwendeten Zellsystems unterschied sich je nach Herstellung der Zellausstrichpräparate.
Der kugelförmige Monozyt war aufgrund seiner Geometrie und seiner Oberflächenbeschaffenheit im Vergleich zur gespreiteten Zelle das weniger geeignete Untersuchungsobjekt zur lichtmikroskopischen autoradiographischen Analyse der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung auf der Zelloberfläche.
Bei der, dem nativen Monozyten ähnlicheren, kugelförmigen Zelle ist die Plasmamembran durch Falten und Furchen gekennzeichnet, sodaß die autoradiographische Zählausbeute verringert

wurde (vergl. Kapitel IV.3., Seite 87). Da die Zuordnung der Silberkörner zusätzlich durch Projektionseffekte erschwert wurde, war bei diesen Präparaten keine zuverlässige Lokalisation der Insulinbindungsstellen möglich.
Kugelförmige Monozyten erlauben daher nur grobe Aussagen über die Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung. Zumindest ließen sich aber "cap" oder "patch"-Bildungen, die auch unter den erschwerten Nachweisbedingungen erfaßt werden müßten, nicht nachweisen (vergl. Kapitel IV.5.1.,Seite 133).
Der gespreitete Monozyt bot aufgrund seiner Morphologie bessere Voraussetzungen für die Verteilungsanalyse. Vor allem bei "flachen" Monozyten traten keine Projektionseffekte auf, die Plasmamembran bildete eine ebene Auswertungsfläche ohne Falten und Ausstülpungen, die eine quantitative Erfassung der membranständigen Insulin-Rezeptor-Komplexe erlaubte; außerdem war die Zelloberfläche groß genug, um statistische Analyseverfahren einzusetzen (vergl. Kapitel IV.5.2.1., Seite 136).

Die beobachteten Verteilungsmuster könnten allerdings durch das Verhalten der Membrankomponenten während der Spreitung beeinflußt werden. Es sollte daher abgeschätzt werden, ob die relative Position der besetzten Insulinrezeptoren zueinander, so wie sie während der Inkubation vorlag, erhalten bleibt, oder ob es zur Umverteilung oder Ausdünnung von Membranarealen kommt.
Anhand von rasterelektronenmikroskopischen Bildern wurde im allgemeinen beschrieben, daß während der Spreitung Falten und Ausstülpungen des Monozyten allmählich zurückgehen, da die "redundante" Membran für die Ausdehnung der Zelle auf dem Substrat verwendet wird; eine Ausdünnung der Membran oder der Einbau neuer Membrananteile wurde nicht beschrieben (DOUGLAS 1976, ACKERMANN und DOUGLAS 1980).
Die gesamte Monozytenpopulation benötigt 10-15 min um bei Raumtemperatur vollständig zu spreiten; nach der für alle autoradiographischen Ausstrichpräparate verwendeten Spreitungsdauer von 5 min sollen erst etwa 30% der Zellen in der typische Form

vorliegen (BUMOL und DOUGLAS 1977).
Die Vermutung, daß der "hohe" Monozyt eine Übergangsform vom annähernd kugelförmigen zum vollständig gespreiteten "flachen" Monozyten darstellt, war daher naheliegend (vergl. Kapitel IV.5.2.1., Seite 136). Die Analyse der Silberkorndichte im Plasmasaum ergab für "flache" und "hohe" Monozyten identische Werte. Während "flache" Monozyten auch über dem Kernareal annähernd gleiche Silberkorndichten wie im Plasmasaum aufwiesen, fanden sich über dem Kernbereich "hoher" Monozyten doppelt so viele Silberkörner pro Flächeneinheit. Sowohl der Dichteunterschied zwischen Kernregion und Plasmasaum als auch die geringere Ausdehnung der "hohen" Monozyten könnten als Indiz dafür gelten, daß bei diesen Monozyten die Plasmamembran zwar im Randbereich maximal ausgebreitet war, daß aber über der Kernregion, auch wenn sie lichtmikroskopisch glatt erschien, ein noch wellenartiges Oberflächenprofil vorlag. Sofern dieses Oberflächenprofil die Zählausbeute noch nicht beeinflußt, erscheint die Konzentration der Silberkörner bzw. Insulinbindungsstellen im Kernbereich "hoher" Monozyten durch die Unterschätzung der tatsächlichen Plasmamembranfläche dichter. Segregierte Verteilungen, die auf der Oberfläche "hoher" Monozyten gefunden wurden, sollten unter dieser Annahme eher den Spreitungszustand als das tatsächliche Verteilungsmuster der Insulinbindungstellen reflektieren.

Das Verhalten von Oberflächenrezeptoren hinsichtlich ihrer räumlichen Anordnung während der Spreitung wurde bisher nicht beschrieben. Allerdings wurde bei einem Vergleich zwischen unbeschichteten und mit Immunkomplex-beschichteten Glasobjektträgern nicht nur eine Veränderung in der Spreitungsform, sondern auch in der Aktivität der FC-Rezeptoren beobachtet, ohne daß andere Rezeptoren wie der Komplement (C3) Rezeptor beeinflußt wurden (DOUGLAS 1976). So zeigte der auf Glas gespreitete Monozyt eine deutliche Bindung von IgG-bedeckten Erythrozyten, während in der Gegenwart der Immunkomplexe keine Interaktion mit den modifizierten Erythrozyten stattfand. Dies

könnte ein Hinweis darauf sein, daß zumindest unter speziellen Bedingungen eine Verlagerung der Oberflächenrezeptoren möglich ist; ob der fehlende Nachweis der FC-Rezeptor Reaktion aber eine Aktivitätsänderung oder eine Umverteilung der Rezeptoren reflektierte, wurde von DOUGLAS (1976) nicht geklärt.
Weitere Hinweise auf die Möglichkeit einer Umverteilung von Membrankomponenten am Monozyten ergaben sich aus den Untersuchungen zur Phagozytose.
Zwischen Spreitung und Phagozytose wird ein Zusammenhang vermutet, so soll der Spreitungsvorgang eine "frustrierte Phagozytose" , also die "in vitro" Manifestation einer natürlichen Aktivität des Monozyten darstellen (NORTH 1968).
Untersuchungen an chemotaktischen bzw. phagozytierenden Monozyten ergaben eine topographische Reorganisation verschiedener Membranproteine. Während ConA-Rezeptoren eine gleichmäßige Verteilung aufrecht erhielten, wanderten FC-Rezeptoren oder Carrierproteine offensichtlich aus dem Bereich der sich bildenden Pseudopoden aus (OLIVER und BERLIN 1982).
Im Fall der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung scheint eine topographische Asymmetrie nicht vorzuliegen. Neben der zum größten Teil zufälligen Anordnung der Silberkörner bzw. Insulinbindungsstellen auf der Einzelzelle, folgte auch ihre auf die Monozytenzellhälfte bezogene Anzahl innerhalb der Monozytenpopulation einer Normalverteilung. Extreme Silberkorndichten, also Monozyten mit sehr vielen oder sehr wenigen Silberkörnern auf der Auswertungsfläche, von denen anzunehmen wäre, das hier eine Verlagerung der Insulin-Rezeptor-Komplexe zu einer Seite der Oberfläche vorlag, wurden nicht beobachtet.
Ein weiteres Argument gegen die Annahme, daß es während des Spreitungsvorgangs zu einer Anhäufung der Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der der Glasunterlage zugewendeten Seite der Monozyten kommen kann, lieferte der grundsätzlich niedrige Anteil an Silberkörnern, die durch hochenergetische Elektronen verursacht wurden. Da die Empfindlichkeit der Photoemulsion gegenüber niederenergetischen Elektronen mit zunehmender Dicke des zu untersuchenden Objekts rasch abnimmt (SEMMLER

und JUNGER 1986), war - auch auf dem dünnen Plasmasaum gespreiteter Monozyten - nicht mit einer Registrierung niederenergetischer Elektronen aus dem, dem Glasobjektträger zugewendeten Oberflächenareal zu rechnen. Wenn eine Verlagerung der Insulin-Rezeptor-Komplexe zur Unterlage hin vorläge, müßte eine steigende Beteiligung der durch hochenergetische Elektronen verursachten Silberkörner am Gesamtsignal zu verzeichnen sein, da die niederenergetischen Elektronen aus diesem Bereich kaum zum Signal beitragen können; dies konnte bei keiner Inkubationsbedingung festgestellt werden.

Da beschrieben wurde, daß der Diffusionskoeffizient der Einzelkomponenten mit zunehmender Größe des sich bildenden Aggregats abnimmt, sodaß bestehende Aggregate eine relative Stabilität erhalten (DE LISI und PERELSON 1976), erscheint es außerdem wenig wahrscheinlich, daß bereits bestehenden "cluster" von Insulin-Rezeptor-Komplexen durch die Ausbreitung der Membran während des Spreitens auseinandertreiben.

Unterschiede im Verteilungsmuster der Insulin-Rezeptor-Komplexe könnten auch auf Fluiditätsunterschieden der jeweils vorliegenden Plasmamembran beruhen. Einflüsse auf die Mikroumgebung des Insulinrezeptors sollten bei der Verteilungsanalyse nicht vernachlässigt werden.
So soll die bei Inkubationstemperaturen von 25 und 37°C zu beobachtende Abnahme der Insulinbindung, die zunächst auf Rezeptordegradation (KAHN et al. 1974), Freisetzung von Rezeptoren ins Medium (GAVIN et al. 1973) oder zunehmende Insulindissoziationsraten (DE MEYTS 1976) zurückgeführt wurde, im wesentlichen durch die Membranfluidität determiniert sein. Von ARMATRUDA und FINCH (1979) wurde beispielsweise beschrieben, daß die mit steigender Temperatur zunehmende Fluidität der Membran zu einer Abnahme an Insulinrezeptoren führt.
Die Annahme, daß die Membranfluidität ein wesentlicher die Insulinbindungskapazität beeinflussender Faktor ist, wurde auch durch Experimente gestützt, bei denen die Lipidzusammensetzung

der Plasmamembran verändert wurde. So erzielten einige Arbeitsgruppen eine weniger starre Lipidmatrix, indem sie den Anteil an ungesättigten Fettsäuren im Lipidgemisch erhöhten; wobei mit zunehmender Fluidität die Insulinbindungskapazität der Insulinrezeptoren abnahm (GINSBERG et al. 1981, GOULD et al. 1982). Diese Änderung in der Bindungskapazität wurde auf eine durch die erhöhte Fluidität induzierte Änderung in der Quartärstruktur des Insulinrezeptors zurückgeführt.
Auch für den Insulinrezeptor von Monozyten wurde dieses Phänomen beschrieben. So wurde auf Monozyten von Neugeborenen, die verglichen mit Monozyten von Erwachsenen eine aufgrund eines höheren Anteils an Cholesterin größere Mikroviskosität der Plasmamembran aufwiesen, eine signifikant höhere Anzahl von Insulinrezeptoren beobachtet (NEUFELD und CORBO 1984). Die Arbeitsgruppe interpretierte die reduzierte Menge an Insulinrezeptoren auf den Monozyten Erwachsener dahingehend, daß ein Teil der Insulinrezeptoren durch die fluidere Membran in die Membranmatrix verlagert wird und so für die Bindung nicht mehr zur Verfügung steht.

Die am Monozyten beobachtete leichte Abnahme der Bindungskapazität beim MONO-125I-(TRY- A14)-Insulin und die deutliche Abnahme beim RANDOM-markierten Insulin bei Inkubationstemperaturen von 25 und 37°C (vergl. Kapitel IV.2.1., Seite 57) könnte unabhängig davon, ob sie Änderungen in der Quartärstruktur des Rezeptors oder das Verschwinden der Rezeptoren von der Oberfläche reflektiert, als Indiz dafür gewertet werden, daß durch die Temperaturerhöhung die Fluidität der Monozytenmembran gesteigert wurde. Durch die weniger starre Lipidmatrix könnte aber auch die laterale Mobilität von Membrankomponenten gesteigert werden. So wäre es vorstellbar, daß bei Temperaturerhöhung Aggregate von Insulin-Rezeptor-Komplexe auftreten. Dies ließ sich aber anhand der hier vorgestellten Verteilungen nicht bestätigen.

Aus der bisher geführten Diskussion der Konsequenzen, die sich durch die Auswahl von Tracer, Detektionsmethode und Zellsystem für die Analyse der Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilung ergeben, geht hervor, daß die Bedingungen bei denen segregierte Verteilungsmuster von Insulinbindungsstellen auf der Monozytenoberfläche auftreten, vor allem auf den Einfluß des Tracers schließen lassen.
Bereits LYEN (1983) beschrieb die von SCHLESSINGER (1980) beobachtete Insulin-Rezeptor-Aggregation als ein Artefakt, das auf der mangelnden Tracerqualität beruhen soll. Der zunehmende Anteil an segregierten Verteilungen beim Einsatz des im Vergleich zum MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin qualitativ schlechteren RANDOM-markierten Insulins stützt diese Hypothese. Die Auswahl des zum Nachweis von Verteilungsmustern geeignetsten Tracers kommt somit eine große Bedeutung zu.
Da alle Arbeitsgruppen, die bisher Verteilungsstudien durchgeführt haben, unterschiedliche Zellsysteme verwendeten, ist ein zellspezifischer Unterschied im Verteilungsmuster der Insulin-Rezeptor-Komplexe nicht vollständig auszuschließen. Grundsätzlich kann aber nicht nur aufgrund der mit Ferritin-Insulin durchgeführten Studien (JARETT und SMITH 1977, JARETT et al. 1980, LYEN et al. 1983), sondern auch durch die im Rahmen dieser Arbeit mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin erstellten Verteilungsstudien festgestellt werden, daß die Fähigkeit zur "cluster"-Bildung keine generelle Eigenschaft besetzter Insulinrezeptoren darstellt.
Die in dieser Arbeit vorgestellte zufällige Anordnung der Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Oberfläche gespreiteter Monozyten kann als weiteres Indiz gegen die Hypothese, daß die insulininduzierte Aggregation von Insulinrezeptoren einen wesentlichen Schritt im Signaltransfer des Insulins bildet, gewertet werden. Da die Aggregation der Insulin-Rezeptor-Komplexe die Basis für das Konzept von SCHLESSINGER bildet, fehlt somit jeder experimentelle Hinweis für die aufgestellte Hypothese. Die Frage danach, ob eine Mikro-"cluster" Bildung im Sinne einer Di- bzw. Oligomerbildung auftritt, kann aber aufgrund des bisher noch nicht ausreichenden Auflösungsvermögens der Detektionsmethoden nicht ausgeschlossen werden.

VII. Z U S A M M E N F A S S U N G

SCHLESSINGER und seine Mitarbeiter beobachteten an Fibroblasten und IM-9 Lymphozyten mit fluoreszenztechnischen Methoden die Aggregation von zelloberflächengebundenen, fluoreszenzmarkierten Insulinen, sowie die nachfolgende Internalisierung der Aggregate. Daraus schlossen die Autoren auf eine ligandeninduzierte Umverteilung der Rezeptoren, die für den Signaltransfer des Insulins und für die "down-regulation" der Insulin-Rezeptoren von Bedeutung sein könnte.

Mit Ferritin-Insulin wurde von JARETT und seinen Mitarbeitern an Hepatozyten- und Fettzellmembranen keine ligandeninduzierte Aggregation der markierten Insulinrezeptoren beobachtet. Somit ist zu fragen, ob die diskrepanten Beobachtungen durch zellspezifische Unterschiede bedingt waren, oder ob sie durch experimentelle Bedingungen, z.B. Eigenschaften der Insulinderivate, die das native Insulin nicht zeigt, zu erklären sind.

In dieser Arbeit wurde daher der Qualität des Tracers Priorität eingeräumt; es wurde MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin verwendet, dessen biologische Eigenschaften dem nativen Insulin vergleichbar sind.

Als Zellsystem wurden menschliche mononukleäre Leukozyten (10-20% Monozyten und 80-90% Lymphozyten) eingesetzt, wobei sich Monozyten, die eigentlich insulinbindenden Zellen, in der gespreiteten Form als ideal für die morphologischen Untersuchungen erwiesen.

In einer Reihe von Bindungsexperimenten wurden die optimalen Markierungsbedingungen ermittelt. Die Lokalisation der Insulin-Rezeptor-Komplexe auf der Monozytenoberfläche wurde bei drei Inkubationstemperaturen 15, 25 und 37°C in zwei unterschiedlichen Insulinkonzentrationsbereichen ($\leq 10^{-9}$ und 10^{-8} mol 125I-Insulin/l) untersucht; wobei mit einer Insulinkonzentration von 10^{-9} mol/l ein Besetzungsgrad der hochaffinen Insulinrezeptoren von etwa 60% und bei 10^{-8} mol/l von > 90% erreicht wurde.

Als topographische Detektionsmethode wurde - in Abhängigkeit vom Tracer - die lichtmikroskopische Autoradiographie gewählt. Der Vorteil dieser Methode lag in der Quantifizierbarkeit, der Nachteil im eingeschränkten Auflösungsvermögen, das allerdings experimentell abzugrenzen war.

Um einen möglichst großen Teil der Zelloberfläche abzubilden, wurden Autoradiogramme von ganzen Zellen hergestellt, indem über Zellausstrichpräparaten die Photoemulsion als dünner Stripping-Film aufgebracht wurde. Durch diese Präparation mußte das autoradiographische Signal dahingehend analysiert werden, welcher Anteil an Silberkörnern ausschließlich von Strahlquellen in der Plasmamembran verursacht worden war.

Beim Zerfall von 125I werden neben weicher γ-Strahlung überwiegend niederenergetische Elektronen mit sehr kurzen Reichweiten (nm-Bereich) und wenige Elektronen mit höheren Energien und entsprechend größeren Reichweiten (um-Bereich) emittiert. Der Anteil dieser hochenergetischen Elektronen am autoradiographischen Signal konnte durch Diskriminierung der niederenergetischen Elektronen mittels geeigneter Filterschichten zwischen Zelloberfläche und Photoemulsion bestimmt werden; er betrug im Mittel zwischen 10 und 16% des Gesamtsignals. Dementsprechend war nur jedes 7.-10. Silberkorn auf eine Strahlquelle zurückzuführen, die in jedem Bereich der Zelle lokalisiert sein könnte, während der überwiegende Anteil der Silberkörner nur von Strahlquellen in der, der Photoemulsion anliegenden Zelloberfläche verursacht werden konnte.
Die Autoradiogramme wurden ausgewertet, indem an lichtmikroskopischen Aufnahmen über den einzelnen Lymphozyten und Monozyten die Silberkörner gezählt und auf die jeweiligen Projektions- bzw. Oberflächen der Zellhälften normiert wurden.
Monozyten zeigten im Ansatz der Totalbindung 10-30-fach höhere Silberkorndichten als Lymphozyten; während bei Lymphozyten etwa 40-50% dieses Signals auf unspezifisch gebundenes Insulin zurückzuführen war, umfaßte die unspezifische Bindung bei Monozyten im niedrigeren Insulinkonzentrationsbereich 2-4% der Totalbindung und im Bereich von 10^{-8} mol Insulin/l etwa 10% bei 15 und 25°C sowie 20% bei 37°C.
Aus Radioaktivitätsmessungen im γ-counter errechneten sich im Ansatz der Totalbindung pro Monozyt bei niedrigerer Insulinkonzentration (10^{-9} mol/l) zwischen 750 (15°C) und 500 (37°C) und im höheren Insulinkonzentrationsbereich (10^{-8} mol/l) zwischen 1100 (15 C) und 600 (37°C) zellgebundene 125I-Insulinmoleküle. Die Autoradiogramme zeigten, daß Monozyten bezüglich des Rezeptorbesatzes eine homogene Population darstellen. Im Ansatz der Totalbindung fanden sich zwischen 400 (15°C) und 200 (37°C) 125I-Insulinmoleküle im niedrigeren Insulinkonzentrationsbereich (10^{-9} mol/l) und zwischen 500 (15°C) und 300 (37°C) 125I-Insulinmoleküle im unphysiologisch hohen Insulinkonzentrationsbereich (10^{-8}mol/l) auf der Oberfläche gespreiteter Monozyten. Kontrollen an Autoradiogrammen von Semidünnschnitten zeigten, daß 20-37% des gesamtgebundenen Insulins internalisiert wurden. Mittels Autoradiographie fand sich somit verglichen mit der Radioaktivitätsmessung im γ-counter im Mittel etwa 20% weniger gebundenes Insulin pro Monozyt; in Anbetracht der gänzlich unterschiedlichen Meßmethoden war diese Bilanz zufriedenstellend.

Auf den Autoradiogrammen waren weder am in Suspension fixierten, noch am gespreiteten Monozyten größere Aggregate von Silberkörnern zu erkennen. Es wurde daher mittels eines statistischen Verfahrens auf eine Tendenz zur "cluster" Bildung geprüft. Diese Analysen wurden nur an vollständig gespreiteten, "flachen" Monozyten vorgenommen, da nur bei dieser Zellform die Zelloberfläche so faltenfrei und glatt war, daß Projektionseffekte ausgeschlossen werden konnten.
Nach Inkubation bei 10^{-9} mol MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin/l wurden bei etwa 90% der Monozyten zufällige Silberkorn, bzw. Insulin-Rezeptor-Komplex Verteilungen ermittelt, und nur bei etwa 10% wurden segregierte Verteilungen nachgewiesen. Die segregierten Verteilungen waren etwa zur Hälfte (3-5% der gesamten Verteilungen) als "cluster"-Formen zu interpretieren, während die restlichen segregierten Verteilungen auf Domänen unterschiedlich hoher Silberkorndichten schließen ließen. Mit Erhöhung der Insulinkonzentration auf 10^{-8} mol /l stieg der Anteil an segregierten Verteilungsformen auf knapp 30%, wobei aber auch hier nur ein geringer Anteil der segregierten Verteilungen (ebenfalls 3-5% bezogen auf die Gesamtheit aller Verteilungen) als "cluster" zu bezeichnen waren.
In einer Reihe von Experimenten war es möglich MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin mit einem jodierten Isomerengemisch (als RANDOM-markiertes Insulin bezeichnet) zu vergleichen. Mit diesem Tracer, der verglichen mit dem MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin veränderte Bindungseigenschaften zeigte, wurde auch im niedrigeren Insulinkonzentrationsbereich (10^{-9} mol/l) ein höherer Anteil an segregierten Verteilungsformen (~30% der Gesamtheit aller Verteilungen) gefunden, wobei 15% der gesamten Verteilungen als "cluster" zu bezeichnen waren.

Die an Monozyten durchgeführten Experimente mit MONO-125I-(TYR-A14)-Insulin geben, ähnlich wie die Befunde von JARETT, keinen Hinweis darauf, daß - wie von SCHLESSINGER beschrieben - durch die Insulinbindung die Aggregation besetzter Rezeptoren induziert wird. Obwohl zellspezifische Unterschiede nicht vollständig auszuschließen sind, werden die Befunde von SCHLESSINGER als ein experimentell bedingtes Artefakt interpretiert.

VI. L I T E R A T U R

ACKERMAN, S.K., DOUGLAS, S.D.: Monocytes. In: The Reticuloendothelial System. A Comprehensive Treatise, Vol. 1, Morphology, pp 297-327, Edt.: Carr, I., Daems, W.T.; Plenum Press, New York, London. (1980)

ACKERMAN, G.A., WOLKEN, K.W.: Histochemical evidence for the differential surface labeling, uptake, and intracellular transport of a colloidal gold-labeled insulin complex by normal human blood cells. J. Histochem. Cytochem. 29: 1137-1149 (1981)

AMATRUDA, J.M., FINCH, E.D.: Modulation of hexose uptake and insulin action by cell membrane fluidity. J. Biol. Chem. 254: 2619-2625 (1979)

ANDERSON, R.G.W., BROWN, M.S., BEISIEGEL, U., GOLDSTEIN, J.L.: Surface distribution and recycling of the low density lipoprotein receptor as visualized with antireceptor antibodies. J. Cell Biol. 93: 523-531 (1982)

ANDERSON, R.G.W., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S.: A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. Nature 270: 695-699 (1977)

ATKINS, H.L.: Radionuclides and the endocrine system. In: Handbook of Radioactive Nuclides, pp 395-422, Edt.: Wang, Y.; The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio (1969)

AVIVI, A., TRAMONTANO, D., AMBESI-IMPIOMBATO, F.S., SCHLESSINGER, J.: Direct visualization of membrane clustering and endocytosis of the thyrotropin into cultured thyroid cells. Mol. Cell. Endocrin. 25: 55-71 (1982)

BACHMANN, L., SALPETER, M.M.: Autoradiography with the electron microscope. A quantitative evaluation. Lab. Invest. 14: 303-315 (1965)

BACHMANN, L., SALPETER, M.M.: Absolute sensitivity of electron microscope radioautography. J. Cell Biol. 33: 299-305 (1967)

BAR, R.S., GORDEN, P., ROTH, J., KAHN, C.R., DE MEYTS, P.: Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients. J. Clin. Invest. 58: 1123-1135 (1976)

BECK-NIELSEN, H., KRAGBALLE, K., PEDERSEN, O., ELLEGARD, J., SØRENSEN, N.S.: Insulin binding and insulin effect in pure preparations of human monocytes. In : Serono Symposium No. 41 "Current Views on Insulin Receptors", Edt.: Andreani, D., De Pirro, R., Lauro, R., Olefsky, J., Roth, J.; Academic Press, London, New York (1981)

BECK-NIELSEN, H., PEDERSEN, O.: Insulin binding, insulin degradation and glucose metabolism in human monocytes. Diabetologia 17: 77-84 (1979)

BECK-NIELSEN, H., PEDERSEN, O., BAGGER, J.P., SCHWARTZ SØRENSEN, N.: The insulin receptor in normal and obese persons. Acta Endocr. 83: 565-575 (1976)

BECK-NIELSEN, H., PEDERSEN, O., KRAGBALLE, K., SCHWARTZ SØRENSEN, N.: The monocyte as a model for the study of insulin receptors in man. Diabetologia 13: 563-569 (1977)

BERGERON, J.J.M., CRUZ, J., KHAN, M.N., POSNER, B.I.: Uptake of insulin and other ligands into receptor-rich endocytic components of target cells: the endosomal apparatus. Ann. Rev. Physiol. 47: 383-403 (1985)

BESAG, J., DIGGLE, P.J.: Simple Monte Carlo tests for spatial pattern. Appl. Statist. 26: 327-333 (1977)

BESSIS, M.: Living blood cells and their ultrastructure. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. (1973)

BIEHLER, D.A., MORRIS, J.W.S.: Preparation and properties of (Monoiodotyrosine)-insulin. Biochem. J. 130: 321-324 (1972)

BLACKARD, W.G., NELSON, N.C.: Portal and peripheral vein immunoreactive insulin concentrations before and after glucose infusion. Diabetes 19: 302-306 (1970)

BLACKETT, N.M., PARRY, D.M.: A simplified method of "hypothetical grain" analysis of electron microscope autoradiographs. J. Histochem. Cytochem. 25: 206-214 (1977)

BLACKETT, N.M., PARRY, D.M.: A new method for analyzing electron microscope autoradiographs using hypothetical grain distributions. J. Cell Biol. 57: 9-15 (1973)

BLUNDELL, T., DODSON, G., HODGKIN, D., MERCOLA, D.: Insulin: The structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. Adv. Prot. Chem. 26: 279-402 (1972)

BLUNDELL, T.L., HUMBEL, R.E.: Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. Nature 287: 781-787 (1980)

BLUNDELL, T., WOOD, S.: The conformation, flexibility, and dynamics of polypeptide hormones. Ann. Rev. Biochem. 51: 123-154 (1982)

BØYUM, A.: Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97): 1-108 (1968)

BØYUM, A.: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. 5 (Suppl. 5): 9-15 (1976)

BUMOL, T.F., DOUGLAS, S.D.: Human monocyte cytoplasmic spreading in vitro: Early kinetics and scanning electron microscopy. Cell. Immunol. 34: 70-78 (1977)

CARO, J.F., MULLER, G., GLENNON, J.A.: Insulin processing by the liver. J. Biol. Chem. 257: 8459-8466 (1982)

CHARLTON, D.E., BOOZ, J.: A Monte Carlo treatment of the decay of 125I. Radiat. Res. 87: 10-23 (1981)

CHENG, K., LARNER, J.: Intracellular mediators of insulin action. Ann. Rev. Physiol. 47: 405-424 (1985)

CLARK, P.J., EVANS, F.C.: Distance to nearest neighbour as a measure of spatial patterns in biological populations. Ecology 35: 445-453 (1954)

COBB, M.H., ROSEN, O.M.: The insulin receptor and tyrosine protein kinase activity. Biochim. Biophys. Acta: 738: 1-8 (1984)

COLE, A.: Absorption of 20-eV to 50000-eV electron beams in air and plastic. Radiat. Res. 38: 7-33 (1969)

CUATRECASAS, P.: Insulin-receptor interactions in adipose tissue cells: direct measurement and properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 : 1264-1268 (1971)

CUATRECASAS, P., HOLLENBERG, M.D.: Membrane receptors and hormone action. Adv. Prot. Chem. 30: 251-451 (1976) Review

CUNNINGHAM, V.L., WOLKEN, K.W., ACKERMAN, G.A.: Insulin complex binding to human peripheral and mitogen-stimulated lymphocytes. J. Histochem. Cytochem. 32: 517-525 (1984)

CZECH, M.P.: Molecular basis of insulin action. Ann. Rev. Biochem. 46: 359-384 (1977) Review

CZECH, M.P.: Insulin action and the regulation of hexose transport. Diabetes 29: 399-409 (1980) Review

CZECH, M.P.: The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. Ann. Rev. Physiol. 47: 357-381 (1985) Review

DENTON, R.M., BROWNSEY, R.W., BELSHAM, G.J.: A partial view of the mechanism of insulin action. Diabetologia 21: 347-362 (1981) Review

DERANLEAU, U.A.: Theory of measurement of weak molecular complexes. 1. General considerations. J. Am. Chem. Soc. 91: 4044-4049 (1969)

DIGGLE, P.J.: On parameter estimation for spatial point processes. J. R. Statist. Soc. B 40: 178-181 (1978)

DIGGLE, P.J.: On parameter estimation and goodness-of-fit testing for spatial point patterns. Biometrics 35: 87-101 (1979)

DIGGLE, P.J., BESAG, J., GLEAVES, J.T.: Statistical analysis of spatial point patterns by means of distance methods. Biometrics 32: 659-667 (1976)

DOUGLAS, S.D.: Human monocyte spreading in vitro - inducers and effects on Fc and C3 receptors. Cell. Immunol. 21: 344-349 (1976)

DOWNS, A., WILLIAMS, M.A.: An iterative approach to the analysis of EM autoradiographs. I. The method. J. Microsc. 114: 143-156 (1978)

DRAZNIN, B., TROWBRIDGE, M., FERGUSON, L.: Quantitative studies of the rate of insulin internalization in isolated rat hepatocytes. Biochem. J. 218: 307-312 (1984)

EBINA, Y., ELLIS, L., JARNAGIN, K., EDERY, M., GRAF, L., CLAUSER, E., OU, J., MASIARZ, F., KAN, Y.W., GOLDFINE, I.D., ROTH, R.A., RUTTER, W.J.: The human insulin receptor cDNA: The structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. Cell 40: 747-758 (1985)

ERTL, H.H., FEINENDEGEN, L.E., HEINIGER, H.J.: Iodine-125, a tracer in cell biology: Physical properties and biological aspects. Pys. Med. Biol. 15: 447-456 (1970)

FELDMAN, H.A.: Mathematical theory of complex ligand-binding systems at equilibrium: Some methods for parameter fitting. Anal. Biochem. 48: 317-338 (1972)

FELDMAN, H.A.: Statistical limits in scatchard analysis. J. Biol. Chem. 258: 12865-12867 (1983)

FERTUCK, H.C., SALPETER, M.M.: Sensitivity in electron microscope autoradiography for 125I. J. Histochem. Cytochem. 22: 80-87 (1974)

FORBERG, S., ODEBLAD, E., SÖREMARK, R., ULLBERG, S.: Autoradiography with isotopes emitting Internal Conversion electrons and Auger electrons. Acta Radiol. 2: 241-262 (1964)

FRANK, B.H., PEAVY, D.E., HOOKER, C.S., DUCKWORTH, W.C.: Receptor binding properties of monoiodotyrosyl insulin isomers purified by high performance liquid chromatography. Diabetes 32: 705-711 (1983)

DE FRONZO, R.A., SOMAN, V., SHERWIN, R.S., HENDLER, R., FELIG, P.: Insulin binding to monocytes and insulin action in human obesity, starvation, and refeeding. J. Clin. Invest. 62: 204-213 (1978)

GAMMELTOFT, S.: Insulin receptors: Binding kinetics and structure-function relationship of insulin Physiol. Rev. 64: 1321-1378 (1984) Review

GAMMELTOFT, S., GLIEMANN, J.: Binding and degradation of 125I-labelled insulin by isolated rat fat cells. Biochim. Biophys. Acta 320: 16-32 (1973)

GAMMELTOFT, S., ØSTERGAARD KRISTENSEN, L., SESTOFT, L.: Insulin receptors in isolated rat hepatocytes. Reassessment of binding properties and observations on the inactivation of insulin at 37°C. J. Biol. Chem. 253: 8406-8413 (1978)

GAMMELTOFT, S., VAN OBBERGHEN, E.: Protein kinase activity of the insulin receptor. Biochem. J. 235: 1-11 (1986)

GARRATT, C.J., HARRISON, D.M., WICKS, M.: The effect of iodination of particular tyrosine residues on the hormonal activity of insulin. Biochem. J. 126: 123-131 (1972)

GAVIN, III, J.R., GORDEN, P., ROTH, J., ARCHER, J.A., BUELL, D.N.:
Characteristics of the human lymphocyte insulin receptor.
J. Biol. Chem. 248: 2202-2207 (1973)

GERSHON, N.D., DEMSEY, A., STACKPOLE, C.W.:
Analysis of local order in the spatial distribution of cell surface molecular assemblies.
Exp. Cell. Res. 122: 115-126 (1979)

GERSHON, N.D., SMITH, R.M., JARETT, L.:
Computer assisted analysis of ferritin-insulin receptor sites on adipocytes and the effects of cytochalasin B on groups of insulin receptor sites.
J. Membrane Biol. 58: 155-160 (1981)

GIESEN, C.:
Verteilung von Insulinrezeptoren auf Monozyten (Korrelation von autoradiographischen und biochemischen Daten).
Diplomarbeit (1981)

GINSBERG, B.H., BROWN, T.J., SIMON, I., SPECTOR, A.A.:
Effects of the membrane lipid environment on the properties of insulin receptors.
Diabetes 30: 773-780 (1981)

GLIEMANN, J., LAURSEN, A.L., FOLEY, J.E., SONNE, O.:
The insulin receptors: looking at the present.
In: Serono Symposium No. 41, "Current Views on insulin receptors", Edt. Andreani, D., De Pirro, R., Lauro, R., Olefsky, J., Roth, J.; Academic Press, London, New York, pp 1-12 (1981)

GLIEMANN, J., SONNE, O., LINDE, S., HANSEN, B.:
Biological potency and binding affinity of monoiodoinsulin with iodine in tyrosine A14 or tyrosine A19.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 87: 1183-1190 (1979)

GOLDSTEIN, J.L., ANDERSON, R.G.W., BROWN, M.S.:
Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis.
Nature 279: 679-685 (1979) Review

GORDEN, P., CARPENTIER, J.-L., FREYCHET, P., ORCI, L.:
Internalization of polypeptide hormones. Mechanism, intracellular localization and significance.
Diabetologia 18: 263-274 (1980)

GOULD, R.J., GINSBERG, B.H., SPECTOR, A.A.:
Lipid effects on the binding properties of a reconstituted insulin receptor.
J. Biol. Chem. 257: 477-484 (1982)

HAIGLER, H.T., MAXFIELD, F.R., WILLINGHAM, M.C., PASTAN, I.:
Dansylcadaverine inhibits internalization of 125I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells.
J. Biol. Chem. 255: 1239-1241 (1980)

HAMLIN, J.L., ARQUILLA, E.R.: Monoiodoinsulin. Preparation, Purification, and characterization of a biologically active derivative substituted predominantly on tyrosine A14. J. Biol. Chem. 249: 21-32 (1974)

HAUCH, M. Insulinrezeptoren im Schweineherzmuskel. Einfluß des Mikromilieus auf die Bindungsqualität. Dissertation 1985

HEPP, R., MEYER, H.E., PETERS, F., PAßLACK, W., REINAUER, H.: The influence of tracers on insulin binding to human erythrocytes. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21: 829-833 (1983)

HOPE, A.C.A.: A simplified Monte Carlo significance test procedure. J. R. Statist. Soc. B 30: 582-598 (1968)

HUNTER, W.M., GREENWOOD, F.C.: Preparation of iodine-131-labelled human growth hormone of high specific activity. Nature 194: 495-496 (1962)

JARETT, L., KIECHLE, F.L., PARKER, J.C.: Chemical mediator or mediators of insulin action: response to insulin and mode of action. Federation Proc. 41: 2736-2741 (1982)

JARETT, L., SCHWEITZER, J.D., SMITH, R.M.: Insulin receptors: Differences in structural organization on adipocyte and liver plasma membranes. Science 210: 1127-1128 (1980)

JARETT, L., SMITH, R.M.: The natural occurrence of insulin receptors in groups on adipocyte plasma membranes as demonstrated with monomeric ferritin-insulin. J. Supramol. Struct. 6: 45-59 (1977)

JEFFREY, P.D.: The interaction of insulin with its receptor: Cross-linking via insulin association as the source of receptor clustering. Diabetologia 23: 381-385 (1982)

JØRGENSEN, K.H., LARSEN, U.D.: Homogeneous mono-125I-insulins. Preparation and characterization of mono-125I-(Tyr A14)- and mono-125I-(Tyr A19)-insulin. Diabetologia 19: 546-554 (1980)

JUNGER, E.: Autoradiographischer Nachweis von Insulin-Rezeptor Komplexen auf Oberflächen isolierter Zellen. Habilitationsschrift (1979)

JUNGER, E.,
BACHMANN, L.:
Methodological basis for an autoradiographic demonstration of insulin receptor sites on the surface of whole cells: a study using light- and scanning electron microscopy.
J. Microsc. 119: 199-211 (1980)

JUNGER, E.,
SAHM, M.,
SEMMLER, M.:
Distribution of 125I-insulin in cardiocytes at steady state binding conditions at 37°C.
submitted, (1986)

KAHN, C.R.:
What is the molecular basis for the action of insulin?
Trends Biochem. Sci. 4: N263-N266 (1979) Review

KAHN, C.R.:
The molecular mechanism of insulin action.
Ann. Rev. Med. 36: 429-451 (1985) Review

KAHN, C.R.,
BAIRD, K.L.,
FLIER, J.S.,
GRUNFELD, C.,
HARMON, J.T.,
HARRISON, L.C.,
KARLSSON, F.A.,
KASUGA, M.,
KING, G.L.,
LANG, U.C.,
PODSKALNY, J.M.,
VAN OBBERGHEN, E.:
Insulin receptors, receptor antibodies, and the mechanism of insulin action.
Recent Prog. Horm. Res. 37: 477-538 (1981) Review

KAHN, C.R.,
BAIRD, K.L.,
JARRETT, D.B.,
FLIER, J.S.:
Direct demonstration that receptor crosslinking or aggregation is important in insulin action.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4209-4213 (1978)

KAHN, C.R.,
FREYCHET, P.,
ROTH, J.:
Quantitative aspects of the insulin-receptor interaction in liver plasma membranes.
J. Biol. Chem. 249: 2249-2257 (1974)

KASUGA,M.,
HEDO, J.A.,
YAMADA, K.M.,
KAHN, C.R.:
The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210000 possible proreceptor.
J. Biol. Chem. 257: 10392-10399 (1982a)

KASUGA,M.,
KARLSSON, F.A.,
KAHN, C.R.:
Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000 dalton subunit of its own receptor.
Science 215: 185-187 (1982b)

KAYES, J.,
MAUNSBACH, A.B.,
ULLBERG, S.:
Electron microscopic autoradiography of radio-iodine in the thyroid using the extranuclear electrons of 125I.
J. Ultrastruct. Res. 7: 339-348 (1962)

KLOTZ, I.M.:
Numbers of receptor sites from scatchard graphs: Facts and fantasies.
Science 217: 1247-1249 (1982)

KLOTZ, I.M., HUNSTON, D.L.: Mathematical Models for ligand-receptor binding. Real sites, ghost sites. J. Biol. Chem. 259: 10060-10062 (1984)

KOPP, F., MEYER, H.E., REINAUER, H.: Insulin receptor protein rendered visible in Triton X-114 membranes. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366: 695-698 (1985)

LEVI, A., SHECHTER, Y., NEUFELD, E.J., SCHLESSINGER, J.: Mobility, clustering, and transport of nerve growth factor in embryonal sensory cells and in a sympathetic neuronal cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3469-3473 (1980)

LEVINE, R., GOLDSTEIN, M.S.V.: Mechanism of hormone action: on the mechanism of action of insulin. Recent Prog. Horm. Res. 11: 343-380 (1955) Review

LINDE, S., HANSEN, B., SONNE, O., HOLST, J.J., GLIEMANN, J.: Tyrosine A14 (125I)monoiodoinsulin. Preparation, biologic properties, and long-term stability. Diabetes 30: 1-8 (1981)

DE LISI, C., PERELSON, A.: The kinetics of aggregation phenomena. I. Minimal models for patch formation on lymphocyte membranes. J. theor. Biol. 62: 159-210 (1976)

LYEN, K.R.: Insulin does not aggregate its own receptor. Diabetologia 24: 304-305 (1983)

LYEN, K.R., SMITH, R.M., JARETT, L.: Differences in the ability of anti-insulin antibody to aggregate monomeric ferritin-insulin occupied receptor sites on liver and adipocyte plasma membranes Diabetes 32: 648-653 (1983)

MAXFIELD, F.R., SCHLESSINGER, J., SHECHTER, Y., PASTAN, I., WILLINGHAM, M.C.: Collection of insulin, EGF and α_2-macroglobulin in the same patches on the surface of cultured fibroblasts and common internalization. Cell 14: 805-810 (1978)

MEAD, R.: A test for spatial pattern at several scales using data from a grid of contiguous quadrats. Biometrics 30: 295-307 (1974)

DE MEYTS, P.: Insulin and growth hormone receptors in human cultured lymphocytes and peripheral blood monocytes. In: Methods in receptor research. Edt. Blecher, M.; Dekker Inc., New York, Basel, pp 301-383 (1976)

MUNSON, P.J.:
Ligand: A computerized analysis of ligand binding data.
In: Methods in Enzymology 92: 543-576 (1983)

MUNSON, P.J., RODBARD, D.:
Ligand: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems.
Analytical Biochem. 107: 220-239 (1980)

NELSON, D.M., SMITH, R.M., JARETT, L.:
Nonuniform distribution and grouping of insulin receptors on the surface of human placental syncytial trophoblast.
Diabetes 27: 530-538 (1978)

NEUFELD, N.D., CORBO, L.M.:
Membrane fluid properties of cord blood mononuclear leucocytes: Association with increased insulin receptors.
Pedriatric Research 18: 773-778 (1984)

NICOLSON, G.L., POSTE, G., JI, T.H.:
The dynamics of cell membrane organization.
In: Dynamic Aspects of Cell Surface Organization. pp. 1-73, Edt.: Poste, G., Nicolson, G.L.; North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford. (1977)

NIR, I., SCHNEIDER, B.G., PAPERMASTER, D.S.
Preembedding labeling with biotinylated antibodies and subsequent visualization of the biotin groups exposed on thin sections.
J. Histochem. Cytochem. 32: 643-648 (1984)

NØRBY, J.G., OTTOLENGHI, P., JENSEN, J.:
Scatchard plot: Common misinterpretation of binding experiments.
Analytical Biochem. 102 318-320 (1980)

NORTH, R.J.:
The uptake of particulate antigens.
J. Reticuloendothel. Soc. 5: 203-209 (1968)

OLEFSKY, J.M., KAO, M.:
Surface binding and rates of internalization of 125I-insulin in adipocytes and IM-9 lymphocytes.
J. Biol. Chem. 257: 8667-8673 (1982)

OLIVER, J.M., BERLIN, R.D.:
Cytoskeleton-membrane interaction and the remodeling of the cell surface during phagocytosis and chemotaxis.
In: Macrophages and natural killer cells.
Adv. Exp. Med. Bio. 155: 113-131; Edt. Normann, S.J., Sorkin, E., Plenum Press, New York (1982)

PEDERSEN, O., BECK-NIELSEN, H.:
A study of insulin receptors in human mononuclear leucocytes.
Acta Endocrin. 83: 556-564 (1976)

PEREZ MACEDA, B., LINDE, S., SONNE, O., GLIEMANN, J.:
(125I)-Diiodoinsulins.
Binding affinities, biologic potencies, and properties of their decay products.
Diabetes 31: 634-640 (1982)

PERRY, J.N.,
MEAD, R.:
On the power of the index of dispersion test to detect spatial pattern.
Biometrics 35: 613-622 (1979)

PETERS, F.,
PINGOUD, A.:
Numerical analysis of binding studies: A direct procedure avoiding the pitfalls of a scatchard analysis of equilibrium data for unknown binding models.
Int. J. Bio-Medical Computing 10: 401-415 (1979)

PETERS,F.,
PINGOUD, V.A.:
A critical interpretation of experiments on binding of peptide hormone to specific receptors by computer modelling.
Biochim. Biophys. Acta 714: 442-447 (1982)

POCKER, Y.,
BISWAS, S.B.:
Self-association of insulin and the role of hydrophobic bonding: A thermodynamic model of insulin dimerization.
Biochemistry 20: 4354-4361 (1981)

POSNER, B.I.,
BERGERON, J.J.M.,
JOSEFSBERG, Z.,
KHAN, M.N.,
KHAN, R.J.,
PATEL, B.A.,
SIKSTROM, R.A.,
VERMA, A.K.:
Polypeptide hormones: Intracellular receptors and internalization.
Recent Prog. Horm. Res. 37: 539-579 (1981)
Review

PULLEN, R.A.,
LINDSAY, D.G.,
WOOD, S.P.,
TICKLE, I.J.,
BLUNDELL, T.L.,
WOLLMER, A.,
KRAIL, G.,
BRANDENBURG, D.,
ZAHN, H.,
GLIEMANN, J.,
GAMMELTOFT, S.:
Receptor-binding region of insulin.
Nature 259: 369-373 (1976)

RABINOVITCH, M.,
DE STEFANO, M.J.:
Macrophage spreading in vitro.
1) Inducers of spreading.
Exp. Cell. Res. 77: 323 (1973)

RAO, C.R.,
CHAKRAVARTI, I.M.:
Some small sample tests of significance for a poisson distribution
Biometrics 12: 264-282 (1956)

RIPLEY, B.D.:
Modelling spatial patterns.
J. R. Statist. Soc. B 39: 172-212 (1977)

RODBARD, D.,
FELDMAN, H.A.:
Theory of protein-ligand interaction.
In: Methods Enzymol. 36: 3-16 (1975)

ROTH, J.: Peptide hormone binding to receptors: A review of direct studies in vitro. Metabolism 22: 1059-1073 (1973) Review

SACHS, L.: Angewandte Statistik. 5. Auflage; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1978)

SALPETER, M.M., FERTUCK, H.C., SALPETER, E.E.: Resolution in electron microscope autoradiography. III. Iodine-125, the effect of heavy metal staining, and a reassessment of critical parameters. J. Cell Biol. 72: 161-173 (1977)

SALPETER, M.M., McHENRY, F.A., SALPETER, E.E.: Resolution in electron microscope autoradiography. IV. Application to analysis of autoradiographs. J. Cell Biol. 76: 127-145 (1978)

SCATCHARD, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660-672 (1949)

SCHLESSINGER, J.: The mechanism and role of hormone-induced clustering of membrane receptors. Trends Biochem. Sci. 8: 210-214 (1980)

SCHLESSINGER, J., SHECHTER, Y., WILLINGHAM, M.C.: PASTAN, I.: Direct visualization of binding, aggregation, and internalization of insulin and epidermal growth factor on living fibroblastic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2659-2663 (1978)

SCHLESSINGER, J., VAN OBBERGHEN, E., KAHN, R.: Insulin and antibodies against insulin receptor cap on the membrane of cultured human lymphocytes. Nature 286: 729-731 (1980)

SCHWARTZ, R.H., BIANCO, R., HANDWERGER, B.S., KAHN, C.R.: Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin-binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leukocytes: Implications for studies of insulin-resistant states in man. Proc. Natl. Sci. Acad. Sci. USA 72: 474-478 (1975)

SEMMLER, M., JUNGER, E. Sensitivity for 125I in light microscope autoradiography. Manuskript in Vorbereitung (1986)

SHECHTER, Y., HERNAEZ, L., SCHLESSINGER, J., CUATRECASAS, P.: Local aggregation of hormone-receptor complexes is required for activation by epidermal growth factor. Nature 278: 835-838 (1979)

SHECHTER, Y., SCHLESSINGER, J., JACOBS, S., CHANG, K.-J., CUATRECASAS, P.: Fluorescent labeling of hormone receptors in viable cells: Preparation and properties of highly fluorescent derivatives of epidermal growth factor and insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2135-2139 (1978)

SIMPSON, I.A., HEDO, J.A.: Insulin receptor phosphorylation may not be a prerequisite for acute insulin action. Science 223: 1301-1303 (1984)

SINGER, S.J., NICOLSON, G.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175: 720-731 (1972)

SMITH, R.M., JARETT, L.: A simplified method of producing biologically active monomeric ferritin-insulin for use as a high resolution ultrastructural marker for occupied insulin receptors. J. Histochem. Cytochem. 30: 650-656 (1982)

SONNE, O., LINDE, S., LARSEN, T.R., GLIEMANN, J.: Monoiodoinsulin labelled in tyrosine residue 16 or 26 of the B-chain or 19 of the A-chain. II. Characterization of the kinetic binding constants and determination of the biological potency. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 364: 101-110 (1983)

SPURR, A.R.: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Ultrastructure Res. 26: 31-43 (1969)

STEINER, D.F.: Insulin today. Diabetes 26: 322-340 (1977)

STEINMAN, R.M., MELLMAN, I.S., MULLER, W.A., COHN, Z.A.: Endocytosis and the recycling of plasma membrane. J. Cell Biol. 96: 1-27 (1983) Review

STEINMAN, R.M., BRODIE, S.E., COHN, Z.A.: Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis. J. Cell Biol. 68: 665-687 (1976)

SUTHERLAND, E.W., ØYE, I., BUTCHER, R.W.: The action of epinephrine and the role of the adenyl cyclase system in hormone action. Recent Prog. Horm. Res. 21: 623-642 (1965) Review

TAGER, H.S., MARKESE, J., KRAMER, K.J., SPEIRS, R.D., CHILDS, C.N.: Glucagon-like and insulin-like hormones of the insect neurosecretory system. Biochem. J. 156: 515-520 (1976)

TAYLOR, R.B., DUFFUS, W.P.H., RAFF, M.C., DE PETRIS, S.: Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. Nature New Biology 233: 225-229 (1971)

TENNANT, J.R.: Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. Transplantation 2: 685-694 (1964)

THORELL, J.I., JOHANSSON, B.G.: Enzymatic iodination of polypeptides with 125-I to high specific activity. Biochim. Biophys. Acta 251: 363-369 (1971)

ULLRICH, A., BELL, J.R., CHEN, E.Y., HERRERA, R., PETRUZZELLI, L.M., DULL, T.J., GRAY, A., COUSSENS, L., LIAO, Y.-C., TSUBOKAWA, M., MASON, A., SEEBURG, P.H. GRUNFELD, C., ROSEN, O.M., RAMACHANDRAN, J.: Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. Nature 313: 756-761 (1985)

WAELBROECK, M.: The pH dependence of insulin binding. A quantitative study. J. Biol. Chem. 257: 8284-8291 (1982)

WAELBROECK, M., VAN OBBERGHEN, E., DE MEYTS, P.: Thermodynamics of the interaction of insulin with its receptor. J. Biol. Chem. 254: 7736-7740 (1979)

WASNER, H.K.: Regulation of protein kinase and phosphoprotein phosphatase by cyclic AMP and cyclic AMP antagonist. FEBS Lett. 57: 60-63 (1975)

WASNER, H.K.: Cyclo-AMP-Antagonist - der Hormonbote des Insulins. Akt. Endokrin. Stoffwechsel 1: 207-208 (1980)

WASNER, H.K.: Biosynthesis of cyclic AMP antagonist in hepatocytes from rats after adrenalin- or insulin-stimulation. FEBS Lett. 133: 260-264 (1981)

WEINER, R.S.: Isolation and characterization of human monocyte subsets. In: Macrophages and natural killer cells. Adv. Exp. Med. Bio. 155: 209-219; Edt. Normann, S.J., Sorkin, E., Plenum Press, New York (1982)

WELINDER, B.S., LINDE, S., HANSEN, B.:
Separation, isolation and characterization of the four monoiodinated insulin tracers using reversed-phase high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. 265: 301-309 (1983)

WHITSON, R.H., KAPLAN, S.A.:
In vitro regulation of human monocyte insulin receptors by insulin and 1-methyl-3-isobutylxanthine.
Am. J. Physiol. 245 (Endocrinol. Metab. 8): E494-E501 (1983)

WILLIAMS, M.A., DOWNS, A.M., JUNGER, E.:
Autoradiographic image spread from 125I-labelled line sources.
Acta Stereol. 2 (Suppl. 1): 249-252 (1983)

WILLINGHAM, M.C., MAXFIELD, F.R., PASTAN, I.H.:
α_2Macroglobulin binding to the plasma membrane of cultured fibroblasts. Diffuse binding followed by clustering in coated regions.
J. Cell Biol. 82: 614-625 (1979)

WILLINGHAM, M.C., PASTAN, I.:
The receptosome: an intermediate organelle of receptor-mediated endocytosis in cultured fibroblasts.
Cell 21: 67-77 (1980)

WILLINGHAM, M.C., PASTAN, I.:
Endocytosis and membrane traffic in cultured cells.
Recent Prog. Horm. Res. 40: 569-587 (1984)

WOLLMER, A., STRAßBURGER, W., HOENJET, E., GLATTER, U., FLEISCHHAUER, J., MERCOLA, D.A., DE GRAAF, R.A.G., DODSON, E.J., DODSON, G.G., SMITH, D.G., BRANDENBURG, D., DANHO, W.:
Correlation of structural details of insulin in the crystal and in solution.
In: Insulin, Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormones. pp. 27-35, Edt. Brandenburg, D., Wollmer, A.; Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York. (1980)

Die vorliegende Arbeit entstand im Diabetes-Forschungsinstitut an der Universität Düsseldorf und wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Frau Priv.-Doz. Dr. E. Junger, meiner Referentin, danke ich besonders für ihre wertvollen Anregungen und Diskussionen, sowie ihr Engagement und Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K.-D. Spindler, meinem Korreferenten, danke ich für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Korreferats und für das Interesse, daß er dieser Arbeit entgegengebracht hat.

Herrn Prof. Dr. H. Reinauer danke ich für die stets gewährte Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Dr. M. Semmler, Frau M. Sahm, Frau E. Jensen und Herrn H. Hoff möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit danken. Frau L. Schröder und Frau R. Zirfas danke ich für die ausgezeichneten Photoarbeiten.

Meinen Freunden, die zur Erstellung dieser Arbeit durch viele interessante und konstruktive Diskussionen beigetragen haben, gilt mein besonderer Dank; vor allem Frau K. Karrenberg, die die Zeichnung zur dreidimensionalen Darstellung der autoradiographischen Auswertungsbedingungen auf kugelförmigen und gespreiteten Monozyten angefertigt hat.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Priv.-Doz. Dr. E. Junger für die Überlassung der transmissions-, bzw. rasterelektronenmikroskopischen Bilder, bei Herrn Dr. H.-J. Bubenzer für die Überlassung des HPLC-Chromatogramms, bei Frau Priv.-Doz. Dr. E. Junger und Herrn Dr. H. Meyer für die radioaktive Markierung des Insulins, bei Herrn Prof. Dr. F. Peters für die Überlassung des nicht linearen Regressionsverfahrens zur Bindungsanalyse, bei Frau Dr. A. Downs und Herrn Prof. Dr. M.A. Williams für die Überlassung des statistischen Analyseverfahrens zur Lokalisation von Strahlquellen, und vor allem bei Herrn Dipl.-Phys. M. Neugebauer für die Erstellung des Auswertungsprogramms zur Abstandsanalyse.

LEBENSLAUF

Geburtstag, -ort:	24. Januar 1957, Krefeld	
Familienstand:	ledig	
Eltern:	Günter Giesen, Gerda Giesen, geb. Maass	
Schulbildung:	1963-1966	Martin-Luther-Grundschule, Krefeld
	1966-1975	Ricarda-Huch-Gymnasium, Krefeld
Abschluß:	1975	Abitur.
Hochschulausbildung:	1975-1981	Studium der Biologie an der Universität Düsseldorf.
	1977	Vordiplom
	1979	mündliche Diplomprüfung in den Fächern Physiologische Chemie, Pflanzenphysiologie und organische Chemie.
	1979-1981	Diplomarbeit bei Frau Priv.-Doz. Dr. E. Junger in der biochemischen Abteilung von Herrn Prof. Dr. H. Reinauer im Diabetes-Forschungsinstitut an der Universität Düsseldorf über das Thema: "Verteilung von Insulinrezeptoren auf Monozyten (Korrelation von autoradiographischen und biochemischen Daten)".
wissenschaftliche Ausbildung:	1981	Beginn der Dissertation bei Frau Priv.-Doz. Dr. E. Junger in der biochemischen Abteilung von Herrn Prof. Dr. H. Reinauer im Diabetes Forschungsinstitut an der Universität Düsseldorf über das Thema: "Induziert Insulin die Aggregation seines Rezeptors? Eine autoradiographische Analyse"
	1981	Einstellung als wissenschaftliche Angestellte (halbtägig) in der biochemischen Abteilung des Diabetes Forschungsinstituts.